



# Efecto de diversos factores de "stress" en el *Clostridium botulinum* con particular referencia al efecto de la actividad acuosa y el pH en el crecimiento y producción de toxina por el tipo G

Briozzo, Jorge Emilio

1985

Tesis Doctoral

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

[www.digital.bl.fcen.uba.ar](http://www.digital.bl.fcen.uba.ar)

Contacto: [digital@bl.fcen.uba.ar](mailto:digital@bl.fcen.uba.ar)

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Fuente / source:

Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Industrias

EFFECTO DE DIVERSOS FACTORES DE "STRESS" EN EL Clostridium  
botulinum CON PARTICULAR REFERENCIA AL EFECTO DE LA ACTI  
VIDAD ACUOSA Y EL pH EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE  
TOXINA POR EL TIPO G

Tesis presentada por  
JORGE EMILIO BRIOZZO  
para optar al título de  
Doctor en Ciencias Químicas  
Director de tesis: Dr. Jorge Chirife

Tesis 1916  
G. 2.

A mi Maestro

A mis padres

Todo aquel que está seriamente interesado en la búsqueda de la ciencia llega al convencimiento de que hay un espíritu que se está manifestando en las leyes del Universo -- un espíritu inmensamente superior al del hombre, y ante el cual nosotros con nuestros modestos poderes debemos sentirnos humildes.

Albert Einstein



Deseo agradecer especialmente al Dr. Jorge Chirife por su apoyo y entusiasmo, que me permitieron concretar este trabajo.

Agradezco:

A la Dra. Ethel Amato de Lagarde, por su colaboración especial en el desarrollo y discusión de los temas inherentes a botulismo.

Al Departamento de Industrias de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), y al Instituto Nacional de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", en cuyas instalaciones se realizó este trabajo.

Al personal de Bacteriología Sanitaria (INM C.G. Malbrán) y en especial a las Sras. María Rufa y Felisa de Oviedo.

Al Dr. Pablo Bozzini por las tomas fotográficas.

Al Dr. Oscar Sudera por su asesoramiento sobre quesos fundidos.

A Ada Albertoni de Planella por su ayuda en la búsqueda bibliográfica.

///

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PROIPA) y a la Secretaría de Ciencia y Técnica (Programa Nacional de Tecnología de Alimentos) por la financiación parcial de este trabajo.

## INDICE

	Página
OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	3
ACTIVIDAD DE AGUA EN ALIMENTOS	8
Ley de Raoult	9
Influencia de la actividad de agua en el desarrollo bacteriano	17
Solutos compatibles	24
Función de los solutos osmorreguladores	26
Mecanismo de resistencia a la actividad de agua reducida	28
BOTULISMO	35
Taxonomía	36
Presencia de <u>Clostridium botulinum</u> para el crecimiento y la producción de toxina	41
- Producción de toxina	41
- Germinación	45

///

- Temperatura de crecimiento	46
- Efecto del pH	47
- Influencia de la actividad de agua	49
Botulismo humano	53
- Botulismo causado por alimentos	55
- Síntomas de la intoxicación botulínica	57
- Botulismo del lactante	59
<u>Clostridium botulinum</u>	61
CONSERVADORES QUIMICOS	66
Sorbato	67
- Efectos fisiológicos	70
- Efecto antimicrobiano	71
- Efecto antibotulínico	74

## PARTE I

EFFECTO DEL SORBATO DE POTASIO EN LA PRODUCCION DE TOXINA  
 POR C. botulinum TIPO A EN UN SISTEMA MODELO DE ACTIVIDAD  
 DE AGUA Y pH REDUCIDOS

MATERIALES Y METODOS	78
El microorganismo	78

Preparación de la suspensión de esporas	78
Preparación del medio Tarozi	79
Sistemas modelo	79
Determinación de la actividad de agua	82
Inoculación de los sistemas modelo	84
Incubación	84
Determinación de la toxina	86
Recuentos	86
Determinación de sorbato de potasio en quesos fundidos	87
RESULTADOS Y DISCUSION	88
CONCLUSIONES	99

## PARTE II

### EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y EL pH EN EL CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE TOXINA POR Clostridium botulinum TIPO G

MATERIALES Y METODOS	101
El microorganismo	101
Medios de cultivo	101

///



Reducción de la actividad de agua	102
Predicción de la actividad de agua de soluciones de NaCl	102
Predicción de la actividad de agua de soluciones de sacarosa	105
Cultivo del microorganismo	106
Incubación	109
Recuentos	110
Determinación de la toxina	110
Shock térmico	111
Determinación de pH	112
RESULTADOS Y DISCUSION	113
Predicción de la actividad de agua de las soluciones de NaCl y sacarosa	113
Shock térmico	113
Condiciones para la actividad de la toxina	118
Efecto del pH y la actividad acuosa	121
Cambios morfológicos	135
Modificación del pH producida por el desarrollo de <u>C. botulinum</u>	147

///



CONCLUSIONES	149
TABLAS DE DATOS DE LA PARTE II	152
BIBLIOGRAFIA	174

## OBJETIVOS

Parte I - Los quesos fundidos se han visto involucrados dos veces en brotes de intoxicación botulínica: uno en Estados Unidos (Meyer and Eddie, 1951), y otro en Argentina (Amato de Lagarde, 1974).

La alta cantidad de humectantes que debería agregarse a este alimento para reducir su actividad de agua ( $a_w$ ) a niveles que impidan el crecimiento del Clostridium botulinum, pueden ocasionar cambios adversos en las características organolépticas del mismo. Este problema podría evitarse parcialmente combinando el efecto de un pH y actividad de agua ligeramente reducidos, con el uso de un agente antimicrobiano tal como el sorbato de potasio. Uno de los objetivos de este trabajo (Parte I) fue estudiar el efecto del sorbato de potasio (SK) en la inhibición del crecimiento y la producción de toxina por el Clostridium botulinum tipo A usando un sistema modelo cuya composición y condiciones de  $a_w$  y pH represente los quesos fundidos para untar producidos en Argentina.

Parte II - Si bien el Clostridium botulinum tipo G no se ha visto

involucrado en ningún caso de toxinfeción alimentaria, su aislamiento y la detección de su toxina en varias autopsias hablan de su posible patogenicidad para el hombre. Desde su primer aislamiento en la provincia de Mendoza (Argentina) en 1969, se han publicado varios trabajos sobre este microorganismo, pero aún es mucho lo que se desconoce. El objetivo de esta segunda parte (Parte II) ha sido determinar el efecto de la actividad de agua y el pH en el crecimiento y la producción de toxina por el Clostridium botulinum tipo G, a 32°C, ya que no se dispone de esta información en la literatura. Se espera que los resultados obtenidos, además de su significado teórico, sean de utilidad práctica ya que ayudarán a garantizar la seguridad de los alimentos procesados.

## INTRODUCCION

En 1974, un queso fundido para untar, con cebolla, causó un brote de botulismo tipo A en Buenos Aires, que afectó a once personas y causó tres muertes (Amato de Lagarde, 1974). Magrini et al. (1983) realizaron un estudio sobre los valores de  $a_w$  y pH de los quesos fundidos para untar producidos en Argentina, y hallaron que la actividad de agua variaba entre 0,968 y 0,978, y el pH entre 5,6 y 6,1. Briozzo et al. (1983) encontraron que el Clostridium botulinum tipo A creció bien y produjo toxina en un medio definido de pH 5,7 y  $a_w$  ajustada en el rango mencionado, pero no se observó desarrollo ni producción de toxina a  $a_w$  0,949 ni por debajo. Además, se encontró, en concordancia con los resultados obtenidos en los medios sintéticos, que se producía toxina en muestras de quesos fundidos para untar ( $a_w$  0,970 y pH 5,7) incubados a 30°C. Aunque las etiquetas de estos productos recomiendan guardarlos refrigerados, generalmente se los somete a excesos de temperatura durante su distribución y almacenaje. Por esa razón, es importante encontrar formas de prevenir o reducir el riesgo del crecimiento y producción de toxina por C. botulinum en quesos fundidos no refrigerados. La reducción de la actividad de agua permitiría alcanzar ese objetivo, pero eso no es siempre po-



sible debido a cambios en el sabor y textura del alimento producidos por la cantidad de soluto necesario para bajar la  $a_w$ .

Wagenaar y Dack (1955) no obtuvieron desarrollo en quesos fundidos, de pH 5,2 a 6,3 cuya  $a_w$  era inferior a 0,95-0,97 (calculada en base a sus datos) y con aproximadamente 1000 ppm de benzoato. Grecz et al. (1965) encontraron una gran estabilidad de la toxina botulínica en quesos fundidos (no declinó su título después de 6 años de almacenaje a 2-4°C). Tanaka et al. (1979) observaron producción de toxina en quesos fundidos de  $a_w$  0,95 y pH 5,8 en 12 semanas, y en 4 semanas a  $a_w$  0,96 y pH 5,9 ambos incubados a 30°C. Kautter et al. (1979) obtuvieron producción de toxina en queso fundido con jamón, a una  $a_w$  y pH tan bajos como 0,936 y 5,70 respectivamente y en queso Limburger de  $a_w$  0,95 y pH 6,26, a 35°C. Es curioso que hallaran toxina a  $a_w$  0,936 (pH 5,7), inferior al mínimo  $a_w$  de desarrollo en condiciones óptimas. Kautter et al. (1981) en iguales condiciones observaron crecimiento y producción de toxina en 26-28 días, en un queso de imitación de pH 5,86 y  $a_w$  0,973, a 26°C. Tanaka (1982 a) comparó dos métodos de inoculación, uno durante el proceso de fabricación del queso, y otro post-proceso y halló discrepancias entre ambos que podrían explicar el extraño resultado de Kautter et al (1979). El método post-proceso consistía en inocular la suspensión de esporas (en solución fisio-

lógica (Kautter et al., 1979) o en agua (Tanaka, 1982)) por medio de una jeringa, introduciendo la aguja en el queso y rotando en círculos a medida que se introducía el inóculo. Tanaka encontró que además de tener zonas con una concentración de esporas muy elevada, se producía una dilución local de los componentes del queso con un incremento de la actividad de agua ya que la humedad subía del 52 al 58% en esas zonas. También podría explicarse el resultado de Kautter et al. (1979) por un error en la determinación de la  $a_w$ .

Actualmente el sorbato de potasio es un aditivo permitido en quesos fundidos en EEUU (Sofos and Busta, 1981) pero su uso no se debe a sus propiedades antibotulínicas sino a su actividad antifúngica. Sin embargo en los últimos años se ha demostrado en diferentes estudios que una concentración de 0,20-0,26% de sorbato de potasio produce cierta inhibición en el crecimiento y producción de toxina por el C. botulinum en diversos productos (Ivey and Robach, 1978; Sofos and Busta, 1980; Sofos et al., 1979 a, b y c; Restaino et al., 1981; Sofos and Busta, 1981). Por este motivo se estudió el efecto del sorbato en la producción de toxina por Clostridium botulinum tipo A en un sistema modelo cuya actividad de agua, pH y composición química se ajustaran de manera de semejar un queso fundido para untar.



El término actividad de agua ( $a_w$ ) fue introducido por Scott (1953, 1957). Los distintos métodos tradicionales de preservación (tales como el salado y curado de carnes, el secado y congelado) y también los métodos recientes (alimentos de humedad intermedia) están basados (al menos parcialmente) en la reducción de la actividad de agua. La  $a_w$  de un medio de cultivo, o de un alimento, influye en el crecimiento, en la actividad metabólica y en la capacidad de sobrevivir de los microorganismos. Por esta razón es importante tener información de los valores de actividad de agua a los cuales los microorganismos pueden multiplicarse y producir toxinas. Basados en esa información, la  $a_w$  de los alimentos puede ser ajustada de manera de mejorar la estabilidad y seguridad de los mismos (Leistner and Rödel, 1975). Si bien existen bastantes estudios sobre los valores de  $a_w$  y pH que permiten la germinación, el desarrollo y la producción de toxina para los distintos tipos de Clostridium botulinum, ya sea en medios de cultivo o en alimentos, éstos no se conocen para el tipo G (Scott, 1957; Baird-Parker and Freame, 1967; Denny et al., 1969; Ohye and Christian, 1966, Marshall et al., 1971; Emodi and Lechowich, 1969; Kautter et al., 1979; Amato de Lagarde and Beerens, 1970; Briozzo et al., 1983). Aunque el estudio de Sonnabend y col. (1981) no pudo confirmar que las muertes fueron producidas por el Clostridium botulinum



tipo G, es muy probable que sea patógeno para el hombre. A pesar de que no han sido descriptos hasta la fecha brotes de botulismo por alimentos, con este tipo toxigénico, la probabilidad de su ocurrencia hace necesario un estudio minucioso de su comportamiento en las condiciones en las que podría desarrollar en los mismos. Todo cambio en las condiciones físicas y/o químicas producido en el medio en el cual se encuentra un microorganismo puede provocar en él una situación de "stress" a la cual muchas veces, puede adaptarse continuando su normal desarrollo. Si las condiciones son extremas, la "injuria" producida puede tornarse irreversible, limitando su crecimiento o provocando la muerte del germen. Teniendo en cuenta la importancia de la actividad de agua y el pH en el desarrollo microbiano, y que estos dos factores pueden ser modificados durante la formulación de los alimentos procesados, se decidió estudiar su influencia en el desarrollo y producción de toxina por el Clostridium botulinum tipo G.

## ACTIVIDAD DE AGUA EN ALIMENTOS

A través de los últimos 20 años la importancia de la actividad de agua en los alimentos atrajo la atención de los microbiólogos, que estudiaron su relación con respecto al desarrollo de los microorganismos. También los químicos observaron su influencia en reacciones de deterioro enzimáticas y no enzimáticas (Troller, 1978). Sin embargo no fue sino hasta el momento en que comenzaron a estudiarse los alimentos de humedad intermedia que adquirió una importancia relevante, tanto en la preservación como en el procesamiento de los alimentos.

Los procesos de preservación de alimentos tienen el objetivo común de extender la duración de éstos de manera de permitir su almacenaje y distribución. La primera y más importante limitación que encontramos a esto es la actividad microbiana. Algunos métodos de preservación que se usan desde tiempos remotos alcanzan este objetivo disminuyendo el agua disponible para los microorganismos (por ejemplo la deshidratación, concentración, salado, agregado de azúcar, etc.) (Karel et al., 1977).

Vamos a detenernos brevemente en esta introducción para repasar algunos conceptos sobre  $a_w$  y su influencia en el desarrollo de los microorganismos.

### La Ley de Raoult

La actividad acuosa puede ser definida como el cociente de la fugacidad del agua en una solución referida a la del agua pura. En las condiciones normales de temperatura y a presión atmosférica la fugacidad puede ser aproximada a la presión parcial de vapor.

$$a_w = \frac{p_w}{p_w^o} \quad (1)$$

con:

$p_w$  = presión de vapor parcial del agua en la solución y  
 $p_w^o$  = presión de vapor del agua pura, ambas a la misma temperatura.

Esta expresión puede interpretarse también como la humedad relativa de equilibrio (HRE) con el alimento.

$$a_w = \frac{\text{HRE}}{100} \quad (2)$$

De acuerdo a la Ley de Raoult para soluciones ideales

///



$p_i = x_i p_i^0$  es decir que la presión parcial de cualquier componente de una solución es igual a la presión parcial del componente puro por su fracción molar en la solución.

Por lo tanto:

$$a_w = x_w = \frac{n_w}{n_w + n_{st}} \quad (3)$$

Puesto que la Ley de Raoult es válida sólo para soluciones ideales, encontramos que esta expresión nos da valores precisos de  $a_w$  sólo para soluciones diluídas (mínimas desviaciones de la idealidad) (Ross, 1975). Para soluciones de no electrolitos esta desviación puede ser pequeña, pero para los electrolitos es generalmente grande, aumentando con el número de iones generados por molécula. Por lo tanto para calcular los valores de  $a_w$  para solutos no ideales se usa un coeficiente osmótico molal  $\phi$ , en la fórmula:

$$\ln a_w = \frac{-v m \phi}{55,51} \quad (4)$$

donde  $v$  es el número de iones generados por molécula y  $m$  la con-

///

centración molal. Los valores de  $\phi$  para electrolitos fueron dados por Robinson y Stokes (1965); para no electrolitos por Scatchard y col. (1938) y Wolf (1966).

También se puede relacionar la presión osmótica con  $a_w$  por la expresión

$$\pi = \frac{-RT}{\bar{V}} \ln a_w \quad (5)$$

$\pi$  es la presión osmótica, y  $\bar{V}$  el volumen parcial molar del agua.

Teniendo en cuenta la importancia de conocer teóricamente el valor de  $a_w$ , Pitzer (1973) desarrolló un sistema de ecuaciones para las propiedades termodinámicas de los electrolitos sobre un análisis del modelo de Debye-Hückel. Dichas ecuaciones ajustan los valores experimentales, dentro del error experimental, tanto para soluciones diluidas como 6 molal. El coeficiente osmótico, es dado por las ecuaciones desarrolladas por Pitzer (1973) de la siguiente forma:

$$\phi - 1 = \left| z_M z_X \right| f + m \left( \frac{2v_M v_X}{v} \right) B_{MX} + m^2 \frac{(v_M v_X)^{3/2}}{v} C_{MX} \quad (6)$$

donde  $v_M$  y  $v_X$  son el número de iones M y X de la fórmula y  $z_M$  y

$z_X$  son sus respectivas cargas en unidades electrónicas; además  $v = v_M + v_X$ . Las otras cantidades son:

$$f = -A \frac{I^{\frac{1}{2}}}{1 + b I^{\frac{1}{2}}} \quad (7)$$

$$B_{MX} = \beta_{MX}^{(0)} + \beta_{MX}^{(1)} \exp(-\alpha I^{\frac{1}{2}}) \quad (8)$$

$\beta_{MX}^{(0)}$  y  $\beta_{MX}^{(1)}$  definen el primero y segundo coeficiente virial y  $C_{MX}$  define el tercer coeficiente virial, e  $I$  (fuerza iónica) =  $\frac{1}{2} \sum m_i z_i^2$ .  $A$  es el coeficiente de Debye-Hückel para la función  $\phi$  y tiene un valor de 0,392 a 25°C. La constante  $b$  se tomó igual a 1,2 para todos los solutos y  $\alpha = 2$  (Pitzer and Mayorga, 1973). Los mejores valores de  $\beta^{(0)}$ ,  $\beta^{(1)}$  y  $C$  para el NaCl a 25°C fueron evaluados por Pitzer y Mayorga (1973) de los coeficientes osmóticos del libro de Robinson y Stokes (1965). Los valores hallados fueron 0,076, 0,2664 y 0,00127 para  $\beta^{(0)}$ ,  $\beta^{(1)}$  y  $C$  respectivamente.

La dependencia de estos parámetros con la temperatura fue dada por Silvester y Pitzer (1978):

$$\beta^{(0)} = q_1 + q_2 \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_r} \right) + q_3 \ln \left( \frac{T}{T_r} \right) + q_4 (T - T_r) + q_5 (T^2 - T_r^2) \quad (9)$$

///



$$\beta^{(1)} = q_6 + q_9(T - T_r) + q_{10}(T^2 - T_r^2) \quad (10)$$

$$C = q_{11} + q_{12}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_r}\right) + q_{13} \ln\left(\frac{T}{T_r}\right) + q_{14}(T - T_r) \quad (11)$$

donde  $T_r = 298,15^\circ\text{C}$  y los parámetros  $q_i$  se dan en la Tabla 1.

Los valores de los parámetros de Debye-Hückel en la ecuación 6 a diferentes temperaturas fueron dados por Ananthaswamy y Atkinsons (1984);  $b$  y  $\alpha$  son independientes de la temperatura.

La Tabla 2 muestra la  $a_w$  de soluciones de NaCl a 15, 25 y  $35^\circ\text{C}$ ; se observa que la temperatura prácticamente no influye en la  $a_w$  en este rango de temperatura, las máximas diferencias son del orden de  $\pm 0,002 a_w$ .

En cuanto a la predicción del  $a_w$  de soluciones acuosas de no electrolitos debemos tener en cuenta el modelo de Norrish (1966) el cual, basándose en un análisis termodinámico de soluciones, propuso la siguiente correlación para sistemas binarios de no-electrolitos que aplicó a soluciones de azúcares y polioles:

$$a_w = X_1 \exp(-KX_2^2) \quad (12)$$

donde  $X_1$  y  $X_2$  son las fracciones molares del agua y del soluto



Tabla 1: Coeficientes de las ecuaciones 9, 10 y 11 (Silvester and Pitzer, 1978)

$$q_1 = 0,0765$$

$$q_2 = -777,03$$

$$q_3 = -4,4706$$

$$q_4 = 0,008946$$

$$q_5 = -3,315 \times 10^{-6}$$

$$q_6 = 0,2664$$

$$q_9 = 6,1608 \times 10^{-5}$$

$$q_{10} = 1,0715 \times 10^{-6}$$

$$q_{11} = 0,00127$$

$$q_{12} = 33,317$$

$$q_{13} = 0,09421$$

$$q_{14} = -4,655 \times 10^{-5}$$

Tabla 2: Actividad de agua de soluciones de NaCl a 15, 25 y 35°C  
(Chirife and Resnik, 1984)

Cóncentración <sup>(1)</sup> % (w/w)	a <sub>w</sub> (15°C)	a <sub>w</sub> (25°C)	a <sub>w</sub> (35°C)
23,50	0,795	0,795	0,795
22,50	0,808	0,808	0,808
21,50	0,821	0,821	0,821
20,50	0,833	0,833	0,833
19,02	0,852	0,850	0,850
18,38	0,859	0,858	0,857
17,70	0,867	0,865	0,864
17,01	0,874	0,873	0,872
15,25	0,891	0,890	0,889
13,42	0,908	0,907	0,906
11,98	0,921	0,920	0,920
10,71	0,930	0,930	0,929
8,25	0,949	0,948	0,948
6,18	0,963	0,962	0,962
2,44	0,986	0,986	0,986

(1) gramos de sal anhidra ...

///

respectivamente y  $K$  es una constante que las correlaciona. Norrish (1966) dio los valores de  $K$  para sacarosa, azúcar invertido, jarabes de glucosa, glicerol y sorbitol (originalmente la ecuación fue definida en logaritmo de base 10). Teng y Lenzi (1974) usaron un polinomio del tipo:

$$a_w = 1 + \sum_{i=1}^k A_i m^i \quad (13)$$

para ajustar datos experimentales de  $a_w$  en soluciones binarias de no-electrolitos recopilados de la literatura;  $m$  es la molalidad del soluto,  $k$  el grado del polinomio,  $A_i$  su coeficiente y  $\sigma$  la desviación standard. El máximo ajuste se obtuvo incrementando  $k$  hasta obtener el menor  $\sigma$  de la regresión. La mayoría de estos datos fueron obtenidos por mediciones precisas de la presión de vapor a través del método isopiéstico.

Para los sistemas multicomponentes Ross (1975) desarrolló una ecuación muy simple para estimar la actividad de agua, a través de varias simplificaciones de la ecuación de Gibbs Duhem

$$\sum n_i d \ln(a_i) = 0 \quad (14)$$

///

donde  $n_i$  es el número de moles del componente  $i$  y  $a_i$  la actividad del componente  $i$ .

Suponiendo que no hay interacción entre los distintos solutos Ross (1975) llega a la expresión

$$a_w = (a_{w_1}^{\circ}) (a_{w_2}^{\circ}) (a_{w_3}^{\circ}) \dots\dots (a_{w_n}^{\circ}) \quad (15)$$

es decir que la  $a_w$  de la mezcla es el producto de la actividad de agua de cada componente ( $a_{w_1}^{\circ}$ ) considerando que está disuelto en toda el agua del sistema, independientemente de los otros. Esta ecuación se cumple muy bien para no electrolitos, y no electrolitos y un electrolito fuerte. Para dos o más electrolitos fuertes comienza a ser menos exacta a valores de  $a_w$  inferiores a 0,95 (Ferro Fontán et al., 1980).

#### Influencia de la actividad de agua en el desarrollo bacteriano

La reducción de la actividad de agua tiene un efecto dramático sobre los microorganismos: se observa que se produce un incremento en la fase lag, disminuye la velocidad de crecimiento y la producción de células (Figura 1). A valores de  $a_w$  inferiores al mínimo para el crecimiento, las células pueden permanecer la-



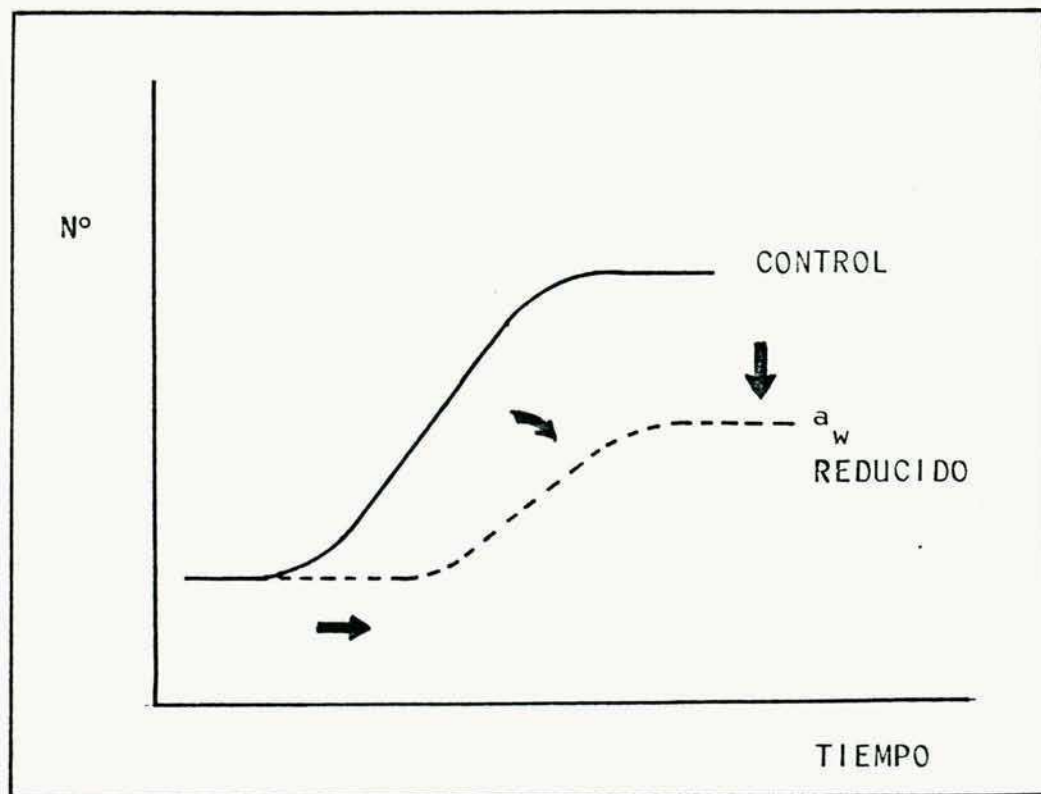


Figura 1: Efecto de la reducción del  $a_w$  en el crecimiento de bacterias (Troller, 1980).<sup>w</sup>

tentes o morir (Sperber, 1983).

En un alimento el microorganismo debe luchar contra una gran variedad de elementos, algunos naturales y otros agregados por el hombre. Por ejemplo el pH (Troller, 1973; Ito and Chen, 1978), la presencia o ausencia de aire (Mead, 1969; Christian and Stewart, 1973; Roberts and Smart, 1976), nitritos y nitratos (Roberts and Ingram, 1973; Tompkin et al., 1978; Benedict, 1981), sorbatos (Boylan et al., 1976; Smoot and Pierson, 1981), temperatura de incubación (Wodzinsky and Frazier, 1960; Abrahamson et al., 1966; Baird-Parker and Freame, 1967; Grecz and Arvay, 1982), y otros factores pueden interactuar poderosamente con el  $a_w$ , para aumentar la inhibición de un microorganismo o grupo de ellos (Troller, 1980). Podríamos ejemplificar ésto con la Tabla 3.

Según Troller y Christian (1978), la mayoría de las bacterias no halofílicas tienen el máximo crecimiento para  $a_w$  0,997-0,980. En términos generales, entre estas bacterias, los bacilos gram-negativos son los más sensibles al  $a_w$  reducido con un mínimo de 0,96-0,94 en medios de cultivo. Para el género Clostridium el mínimo está entre 0,95-0,94 y para el género Bacillus 0,93-0,90. El rango más amplio lo presentan las Micrococaceas con un  $a_w$  mínimo entre 0,95-0,86. Las bacterias halofílicas en cambio, crecen a bajas  $a_w$  (producidas por sales inorgánicas).

///

Tabla 3: Crecimiento de Clostridium botulinum tipo B a varios niveles de temperatura, pH y  $a_w$  (Ohye and Christian, 1966).

Temperatura	pH	$a_w$						
		0,997	0,99	0,98	0,97	0,96	0,95	0,94
20°C	5							
	6	4 (b)	9	9				
	7	2	2	4	9			
	8	2	2	4	14			
	9							
30°C	5							
	6	2	2	3	9			
	7	1	1	2	3	9	14	
	8							
	9							
40°C	5							
	6	1	2	2	3	14		
	7	1	1	1	2	3	9	17
	8	1	1	1	2	9	14	
	9							

(b) período de incubación (días) antes de que se observase crecimiento. No hubo crecimiento a 10°C



Los hongos son los microorganismos más osmotolerantes, por ejemplo el Xeromyces bisporus, según Scott (1957), y Pitt y Christian (1968), pueden crecer a un  $a_w$  tan bajo como 0,60. Pero la mayoría de los hongos tienen un  $a_w$  límite entre 0,80-0,95 y las levaduras 0,88-0,95 (Corry, 1971). Puesto que las bacterias son microorganismos que crecen rápidamente, en condiciones favorables crecerán más que los hongos.

La Tabla 4 da los valores mínimos para el crecimiento de algunos microorganismos asociados con alimentos.

Ha sido bastante bien demostrado que la principal reacción de las células microbianas a los cambios ambientales de  $a_w$  (producidos por el agregado de solutos no penetrantes como el NaCl y la sacarosa), es la regulación de su contenido interno de solutos de manera de exceder levemente la osmolalidad exterior y evitar así la pérdida de agua. Si la presión osmótica del medio es tan elevada que excede la capacidad osmorreguladora de la célula bacteriana, se pierde agua irreversiblemente, cesa el crecimiento y se produce la muerte a una velocidad que depende tanto del  $a_w$  como de otros factores ambientales.

La célula parcialmente deshidratada se hace metabólicamente menos activa (o queda en estado de latencia) y puede incrementar considerablemente su resistencia térmica, como ocurre con Salmo-

Tabla 4: Mínimo  $a_w$  para el crecimiento de microorganismos asociados a alimentos (Rocland and Stewart, 1981)

$a_w$	Bacterias	Levaduras	Hongos
0,98	Clostridium botulinum tipo C	---	---
0,97	C.botulinum tipo E	---	---
0,96	Klebsiella, shigella	---	---
0,95	Bacillus, C. botulinum tipos A y B	---	---
0,94	Lactobacillus	---	Stachybotrys
0,93	Streptococcus	---	Botrytis, Mucor, Rhizopus
0,92		Rhodotorula	
0,90	Micrococcus, Staphylococcus aureus Anaeróbico	Hansenula, Saccharomyces	---
0,88	---	Cándida, Debaryomyces	Cladosporium
0,87	---	Debaryomyces	---
0,86	Staphylococcus aureus Aeróbico	---	---
0,84	---	---	Alternaria, Paecilomyces

Tabla 4 (continuación)

0,83	---	Debaryomyces	---
0,81	---	Saccharomyces	Penicillium
0,78	---	---	Aspergillus
			Esmericella
0,75	Halobacterium, Halococcus	---	Wallemia
0,70	---	---	Chrysosporium
0,62	---	Saccharomyces	Eurotium
0,61	---	---	Monascus
			(Xeromyces)

---



nella typhimurium en altas concentraciones de azúcares (Gould, 1985). Las esporas bacterianas tienen un bajo contenido de agua en el citoplasma (aunque estén suspendidas en agua pura). Se piensa que esa disminución del contenido de agua de la espora es la causa principal del incremento de resistencia térmica respecto a la célula vegetativa (casi 40°C) (Gould, 1985).

#### Solutos compatibles

Se encontró que el tipo de soluto utilizado para bajar el  $a_w$ , tiene cierto efecto sobre el mínimo valor de actividad de agua que permite el crecimiento de los microorganismos. Así el KCl, glucosa o sacarosa tienen un efecto semejante. El glicerol en cambio permite el desarrollo a valores bastante inferiores de  $a_w$ . El glicerol penetra libremente a la célula. Este efecto puede observarse en la Tabla 5.

Se denomina "solute compatible" a aquél que siendo osmóticamente activo se acumula intracelularmente, para contrarrestar el desequilibrio osmótico producido al exponer la célula a una  $a_w$  reducida (Gould and Measures, 1977). En términos generales, se encontraron iones potasio en bacterias halofílicas, polioles en levaduras, prolina en bacterias osmotolerantes, ácido  $\gamma$ -aminobu-



Tabla 5: Influencia del soluto en el mínimo  $a_w$  para el crecimiento de bacterias (Sperber, 1983)

Organismo	Mínima $a_w$ para el crecimiento en		
	NaCl	Glucosa	Glicerol
<u>Clostridium perfringens</u>	0,97	0,96	0,95
<u>Clostridium botulinum</u> tipo E	0,97	----	0,94
<u>Clostridium sporogenes</u>	0,945	0,965	0,935
<u>Lactobacillus helveticus</u>	0,963	0,966	0,928
<u>Streptococcus thermophilus</u>	0,985	0,986	0,947
<u>Streptococcus lactis</u>	0,965	0,949	0,924
<u>Pseudomonas fluorescens</u>	0,957	-----	0,940
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	0,948	0,984	0,937

tífico en bacterias moderadamente osmotolerantes y ácido glutámico en las bacterias menos osmotolerantes (Troller, 1980). Sin embargo la lista de solutos compatibles u osmorreguladores continúa incrementándose.

#### Función de los solutos osmorreguladores

Los diferentes estudios de plasmólisis y deplasmólisis así como los de los cambios de contenido de agua intracelular, confirman que el rol de los solutos compatibles es retener suficiente agua en el citoplasma como para mantener su actividad metabólica. Es más, se ha verificado que estos solutos generalmente permiten que continúe la actividad enzimática a valores de  $a_w$  más bajos que los que permiten la mayoría de los solutos extracelulares (Gould, 1985).

Así el glicerol y otros polioles son pobres inhibidores de la actividad enzimática de diversas enzimas; el cambio enzimático de Entner-Doudoroff se inhibió un 50% en Pseudomonas fluorescens a  $a_w$  0,98 con NaCl, con sacarosa aproximadamente a 0,96 y 0,85 con glicerol (Prior and Kenyon, 1980).

El glutamato de potasio permite la actividad de las enzimas que metabolizan la glucosa (en Ps. fluorescens) a valores más

bajos que el NaCl (Measures, 1975). Glicina betaína es menos inhibidora que glicerol y prolina. La sacarosa y la dimetil glicina son levemente menos inhibidoras, mientras que el NaCl inhibía un 90% la actividad enzimática y el  $\text{CaCl}_2$  un 100% (Gould, 1985).

Algunos de estos solutos protegen a las proteínas de la desnaturalización por calor. Se demostró que los polioles protegen a la lisozima y la ribonucleasa, y que este efecto se incrementa con el número de oxhidrilos del poliol. L y D-prolina, betaína y otros aminoácidos protegen la  $\alpha$ -amilasa.

Aún permanece desconocido el mecanismo detallado por el cual algunos microorganismos ejercen el control sobre el nivel citoplasmático de solutos, en respuesta a cambios osmóticos del medio ambiente. Es ampliamente aceptado que el flujo de agua a través de la membrana celular es pasivo. Por lo tanto el control debe ocurrir por medio de cambios en la osmolalidad y/o a través de cambios de fuerzas físicas tales como la resultante de la contracción o expansión celular (Gould, 1985).

El crecimiento a bajas  $a_w$  conduce a cambios en la composición lipídica de la membrana. Se postula que el movimiento de lípidos desde un reservorio dentro o fuera de la membrana a medida que se contrae o se expande puede actuar para mantener la tensión y transmitir información de la presión osmótica externa (Gould,



1985).

Mecanismo de resistencia a la actividad de agua reducida

A medida que se reduce la actividad de agua, se observa que algunas bacterias dejan de desarrollar a altas  $a_w$ , mientras que otras son capaces de continuar creciendo a valores muy inferiores.

Al reducir el  $a_w$  del medio externo las células son sometidas a un shock osmótico y rápidamente pierden agua. Esto se denomina plasmólisis. Así S. aureus al ser pasado de un medio de  $a_w$  0,995 a otro de  $a_w$  0,95 pierde aproximadamente un 50% de su agua intracelular, y Salmonella typhimurium aproximadamente 44% (Sperber, 1983). Durante la plasmólisis la célula no crecerá y puede morir o permanecer latente. Para poder crecer debe reducir su  $a_w$  intracelular para recuperar su turgencia. Las posibilidades de lograr ésto serían dos: introducir el soluto que redujo el  $a_w$  externa o acumular o producir un soluto diferente que sea capaz de reducir el  $a_w$  interior a medida que permite que continúe la actividad enzimática. Sin embargo la actividad enzimática no es necesariamente el determinante de la restricción de crecimiento por reducción de la  $a_w$  ya que se vió con varios microorganismos que



estos se inhibían a valores de  $a_w$  muy superiores a los que inhiben varios caminos metabólicos (Tabla 6).

La figura 2 muestra un esquema de los eventos intracelulares: la célula se encuentra en su máximo crecimiento a  $a_w$  0,995. Está turgente y con su pool normal de iones potasio y glutamato. Cuando se la coloca en un  $a_w$  inferior, por ejemplo 0,950, pierde agua y cesa de crecer. Al disminuir su contenido de agua intracelular se incrementa la concentración de iones potasio existentes. Esta concentración incrementada de  $K^+$  activa la glutamato deshidrogenasa que realiza una aminación reductiva de  $\alpha$ -ceto glutarato a glutamato, el cual comienza a acumularse en la célula. A medida que se produce glutamato, comienza a entrar agua en la célula y se reinicia el desarrollo, aunque a una velocidad reducida (Sperber, 1983).

Todas las bacterias examinadas mostraron la acumulación de un aminoácido cuando se la tensionó osmóticamente. Aquéllas que acumulan glutamato solamente suelen ser incapaces de crecer por debajo de  $a_w$  0,950. El glutamato, al estar cargado negativamente al pH de la célula, necesita un catión que equilibre su carga (generalmente  $K^+$ ). Cuando la concentración de glutamato es suficiente para reducir la actividad de agua a 0,950 la concentración de iones potasio es tan elevada que resulta tóxica para algunas fun-

Tabla 6: Influencia de la actividad de agua y el soluto en la actividad enzimática del camino metabólico de Entner-Doudoroff (Sperber, 1983)

Enzimas	Mínima $a_w$ para actividad		
	NaCl	Sacarosa	Glicerol
Glucosa $\rightarrow$ Glutamato-6-P:			
Vía glucosa-6-P			
Glucoquinasa	0,98	0,92	0,82
G-6-P Deshidrogenasa	0,965	0,92	<0,80
Vía gluconato			
Glucosa Deshidrogenasa	<0,80	<0,86	<0,80
Glucoquinasa	<0,80	<0,86	<0,80
Vía 2-Cetogluconato			
Gluconato Dihidrogenasa	<0,80	<0,86	<0,80
2-Cetogluconatoquinasa +	0,96	<0,86	<0,80
Cetofosfogluconato reductasa			

///

Tabla 6 (continuación)

Gluconato-6-P a Piruvato

6-Fosfogluconato deshidratasa <0,80 <0,86 <0,80

+ Cetodeoxifosfogluconato

aldolasa

---

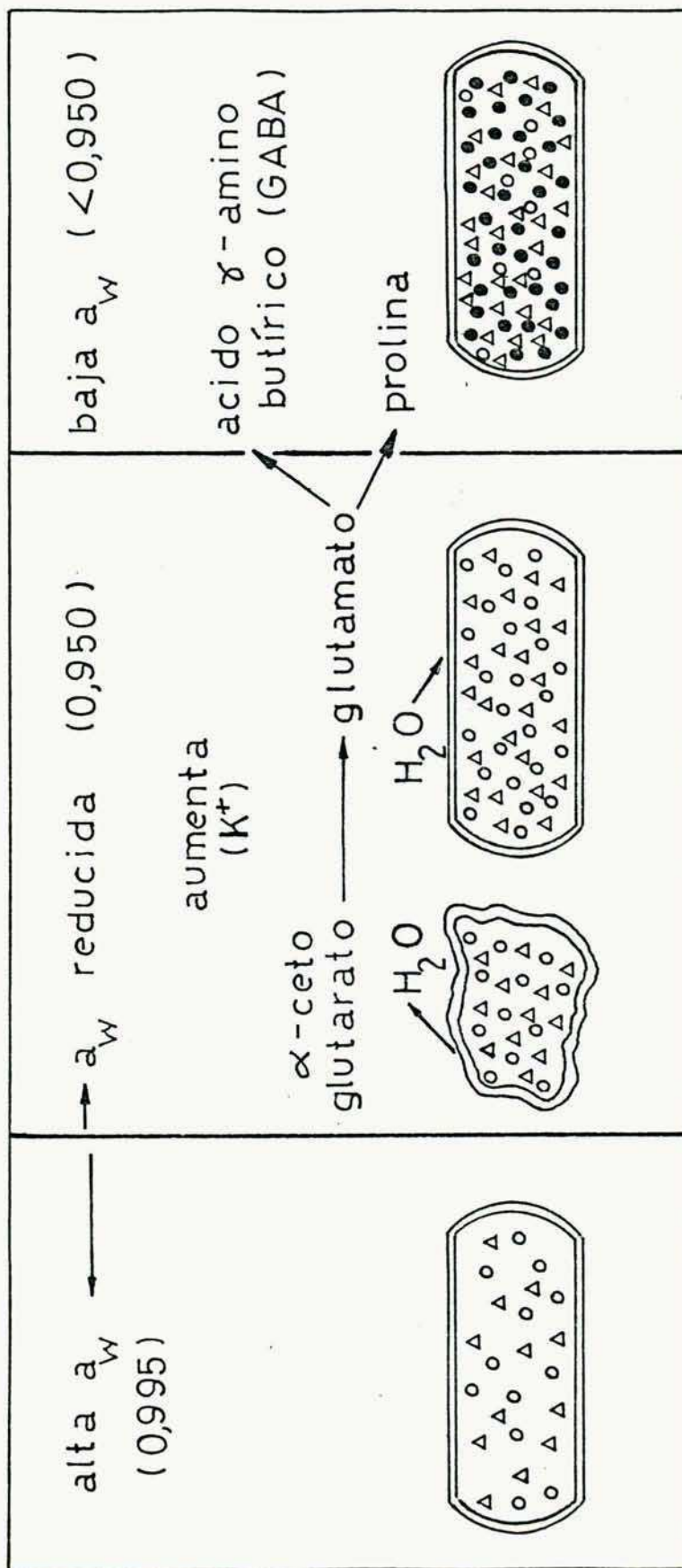


Figura 2: Adaptación intracelular a un medio de baja actividad de agua (Sperber, 1983)



ciones de la célula y cesa de crecer (Sperber, 1983).

Algunas bacterias pueden descarboxilar el glutamato a ácido  $\gamma$ -aminobutírico o reducirlo a prolina. Puesto que éstos son aminácidos relativamente sin carga que no necesitan un catión que los balancee, las células que los acumulan podrán crecer a valores de  $a_w$  inferiores que aquellos que sólo acumulan glutamato (Sperber, 1983).

Las células normales tienen entre 2 y 15 mM de prolina y este valor se incrementa hasta 1600 mM cuando se la somete a un cambio osmótico. Con una concentración de 1600 mM de prolina el  $a_w$  sería aproximadamente 0,86 y la célula estará tan llena de este compuesto que 1 de cada 20 moléculas sería prolina (Sperber, 1983).

Las bacterias halofílicas tales como Halobacterium sp. que pueden crecer a  $a_w$  0,75 emplean otro mecanismo y no son comunes en microbiología de alimentos aunque pueden deteriorar el pescado salado (Sperber, 1983).

La Tabla 7 muestra las características de algunos solutes compatibles

Tabla 7: Tabla de características de algunos solutos que se acumulan en la célula a actividades de agua reducidas

Solutos compatibles	PM	Solubilidad (% P/P sol)	$a_w$ de saturación
KCl	74,6	26,7	0,943 (a)
K, L-glutamato	185,2	47,8	0,630 (b)
L-prolina	103	45,5	0,640 (b)
glicerol	92,09	totalmente soluble	
D-arabitol	152	59,1	0,819 (b)
manitol	182	14	0,978 (c)

(a) Robinson and Stokes (1965)

(b) Chirife et al. (1984)

(c) Seow and Teng (1981)

///

## BOTULISMO

Si bien el botulismo como causa de intoxicación alimentaria se conoce desde hace casi 90 años, es probable que existiera como una enfermedad humana por miles de años, desde los primeros intentos de preservar alimentos para un consumo posterior. Un incompleto salado o encurtido de carnes, pescado o vegetales eliminaba la mayoría de los microorganismos competidores y creaba condiciones favorables para la producción de la toxina botulínica.

Desde su primer aislamiento a partir de un jamón crudo en 1896, el Clostridium botulinum ha sido asociado con carnes crudas curadas y en efecto, su nombre deriva de "botulus", el término en latín para designar embutido. Por un tiempo, el botulismo o enfermedad de Kerner (como se conocía antes) se pensó que estaba asociada exclusivamente con embutidos de varios tipos. Sin embargo a fines del siglo XIX, otros alimentos se vieron involucrados en brotes de botulismo en Europa y Estados Unidos (Troller and Christian, 1978). De todas maneras, la etimología del término poco o nada tiene que ver con el botulismo de hoy en cualquier parte, pues en general se origina por la ingestión de alimentos envasados, en su mayoría de origen vegetal. En nuestro país el primer caso registrado data de 1922 y la frecuencia de los brotes



ha permanecido estacionaria o con tendencia a aumentar. De cualquier modo, no es de esperar una disminución (o menos una erradicación) de esta intoxicación en los años venideros, pues mientras se sigan preparando conservas industriales sin rigurosos controles de elaboración, mientras se elaboren alimentos caseros que se conserven en forma inadecuada, o se incremente la producción de algunas técnicas de elaboración como son el ahumado y el envasado al vacío, estarán dadas las condiciones que el Clostridium botulinum desarrolle en aquellos medios produciendo su poderosa exotoxina (Gimenez y Ciccarelli, 1976).

#### Taxonomía

El género Clostridium botulinum comprende bacilos anaerobios Gram positivos, catalasa negativos, mesófilos, generalmente movidos por flagelos peritricos y con esporas terminales o subterminales esféricas u ovaladas (Bergey, 1974). Muchos forman exotoxinas y son patógenos para el hombre, tales como el Clostridium tetani, causante de tétanos; C. perfringers, C. septicum, C. histolyticum, C. sordelli son microorganismos asociados en casos de gangrena gaseosa; C. perfringers, intoxicación alimentaria; C. botulinum, cuasante del botulismo.



Clostridium botulinum no es una especie bacteriana única, sino más bien un conglomerado de varios grupos culturalmente distintos, semejantes sólo en que producen toxinas de similar acción farmacológica. El subcomité sobre Clostridium del VI Congreso Internacional de Microbiología recomendó que sólo se usase el nombre botulinum para los microorganismos que producían neurotoxina botulínica (Smith, 1977).

Se han reconocido siete tipos de Clostridium botulinum, en base a las diferencias antigénicas de las toxinas producidas por las distintas cepas, y se las denominó en orden alfabético de A a G. Las toxinas de los tipos A, B, E y F son tóxicas para el hombre; las de las cepas restantes (C, D y G) afectan a mamíferos, pájaros, aves y tortugas (Smith, 1977; C.D.C., 1979; Benedict, 1980). Para el tipo G si bien no se ha confirmado su patogenicidad para el hombre, es muy probable que lo sea (Sonnabend et al., 1981).

Cada uno de los tipos A, B, E, F y G produce una sola toxina que es altamente específica, pues prácticamente no existen reacciones cruzadas de neutralización entre ellas. La identificación correcta de una toxina botulínica debe realizarse a través de pruebas de neutralización cuantitativas. Los tipos C y D producen toxinas  $C_1$ ,  $C_2$  y D, por lo que reaccionan en forma cruzada con sus respectivas antitoxinas.

Del tipo C tenemos el  $C_{\alpha}$  y el  $C_{\beta}$ . El primero produce principalmente toxina  $C_1$  y pequeñas cantidades de  $C_2$  y D, en cambio el C produce sólo  $C_2$ . El tipo D produce principalmente D y pequeñas cantidades de  $C_1$  y  $C_2$ . Según Gimenez y Ciccarelli (1978) los antígenos  $C_1$ ,  $C_2$  y D integrarían un sólo tipo serológico, con variaciones en la distribución de esas fracciones antigénicas, como se expresa al clasificarlas como tipos  $C_{\alpha}$ ,  $C_{\beta}$  y D; es decir que la molécula de toxina C y la de toxina D comparten entre sí fracciones antigénicas.

Se han encontrado además, tres subtipos:  $A_f$ ,  $B_f$  y  $B_a$ . La letra mayúscula indica la fracción tóxica dominante (90-99%) (Gimenez et al., 1985). La diferencia al clasificarlos como subtipos radica en que éstos producen dos tipos de moléculas de toxina y no una molécula con dos o tres fracciones antigénicas. Esto fue confirmado por Sugiyama y col. (1972).

Desde el punto de vista de las características culturales y serológicas se los dividió en 4 grupos:

Grupo I: o de las cepas proteolíticas. Comprende todas las del tipo A y las cepas proteolíticas de los tipos B y F, y C. sporogenes.

Grupo II: C. botulinum C y D, y C. novyi



Grupo III: C. botulinum tipo E y cepas no proteolíticas de los tipos B y F.

Grupo IV: C. botulinum tipo G (proteolítico pero no sacarolítico).

La validez de estos grupos se ha puesto más de manifiesto por la homología de los valores de DNA de cepas toxigénicas y no toxigénicas y de cepas proteolíticas (Lee and Rieman, 1970 a y b), de C. botulinum; del aislamiento de fagos líticos de los tipos B, F y E (Sugiyama and King, 1972); de la relación de los antígenos somáticos de cepas proteolíticas y no proteolíticas (Solomon et al., 1971) y de los experimentos de conversión de C. botulinum tipo C en C. novyi tipo A por bacteriófago (Eklund et al., 1974).

#### Presencia de C. botulinum

El Clostridium botulinum se ha encontrado en el suelo de todos los continentes, en los sedimentos marinos y en el contenido intestinal de aves y mamíferos; probablemente es en el suelo donde más frecuentemente se presenta, y debido a la gran resistencia de sus esporas a la desecación y al calor, éstas pueden contaminar una gran variedad de alimentos (Smith, 1977). El tipo E

es principalmente acuático y se halla relacionado con los casos de intoxicación por consumo de pescado y sus derivados ahumados y en conserva. Los tipos A y B en general se encuentran en alimentos sujetos a contaminación con el suelo. Según Troller y Christian (1978), en América, los brotes de intoxicación se deben principalmente al tipo A, mientras que en Europa son más frecuentes del tipo B. Además las áreas geográficas con gran consumo de pescados y derivados (como Japón y Escandinavia) son más proclives a una mayor incidencia del botulismo tipo E. En Estados Unidos, de 32 brotes de tipo E ocurridos entre 1963 y 1977, uno se debió a hongos enlatados y el resto a productos marinos (C.D.C., 1979).

En nuestro país las áreas de mayor incidencia de botulismo humano han sido las zonas de Cuyo y el valle de Río Negro y la provincia de Buenos Aires. En las primeras es debido a la gran producción de conservas caseras y en la última al elevado consumo de conservas. En cuanto al botulismo animal, en la provincia de Corrientes es bastante serio el "mal de aguapey", nombre con el que se conoce al botulismo en bovinos (Giménez et al., 1982).

En estudios hechos por Giménez y Ciccarelli (1970 a) en la provincia de Mendoza y por Giulietti de Rigo (1973) en Córdoba y San Luis se lo encontró presente en un elevado número de



muestras de suelo: 38% para Mendoza, 35% para San Luis, y 39% para Córdoba. Fue notable además la multiplicidad de tipos: A, B, F, G y el subtipo A<sub>f</sub> (Giménez y Ciccarelli, 1976). Los diferentes tipos serológicos se hallaron en la siguiente proporción: A (63%); B (16%), F (5%), G (menos de 1%), subtipo A<sub>f</sub> (7%) y otros no determinados por la baja concentración de toxina en los cultivos (9%) (Ciccarelli et al., 1983).

#### Requerimientos de Clostridium botulinum para el crecimiento y producción de toxina

##### Producción de toxina

Las toxinas botulínicas son proteínas que se producen intracelularmente como protoxinas. Se liberan cuando las células vegetativas se lisan y se activan a la máxima toxicidad por la acción de enzimas proteolíticas. Los tipos proteolíticos de Clostridium botulinum pueden activar sus propias toxinas. Las toxinas producidas por los tipos no proteolíticos se activan por proteasas exógenas, tal como la tripsina en el estómago del hospedador (Sperber, 1982). Algunas cepas producen una toxina de tamaño molecular uniforme, mientras que otras lo hacen de dos o tres ta-

maños distintos. Todas las toxinas botulínicas están compuestas de un compuesto neurotóxico de un peso molecular aproximado de 150.000 y un componente no tóxico con un PM de 150.000 o más. La toxina botulínica en su forma compleja puede clasificarse en tres grupos, basados en su tamaño molecular: 12S, 16S y 19S. La tipo A presenta las tres formas; la B, C y D presentan sólo las 12S y 16S; mientras que la E y F presentan sólo la 12S. Dentro de un mismo tipo inmunológico, a mayor tamaño molecular de la toxina, mayor es la toxicidad por vía oral, pero menor por vía parenteral (Sakaguchi, 1983),

Parecería que la producción de toxina de todos los tipos estaría gobernada por fagos lisogénicos (Smith, 1977). Un alimento puede contener C. botulinum y sin embargo no causar botulismo ya que si el microorganismo no crece no se produce toxina (Baird Parker, 1971; Kautter and Lynt, 1976; Troller and Christian, 1978; FDA, 1976). Según Ohye y Christian (1966) cuando hay crecimiento, las cepas de C. botulinum no son tóxicas, por lo tanto los valores mínimos de actividad de agua para la producción de toxina son equivalentes a los de crecimiento: 0,95 para el tipo A, 0,94 para el tipo B y 0,97 para el E, que corresponden a 8,0; 9,4 y 5,1% p/p de NaCl. Se debe tener en cuenta que los niveles de NaCl que previenen el crecimiento, hacen al alimento organolep-



ticamente inaceptable, por lo que es importante tener en cuenta el efecto combinado de diferentes factores inhibitorios.

Dos manifestaciones de deterioro en los alimentos son el hinchamiento de los envases debido a la producción de gas y los productos de degradación de las proteasas. De todas maneras la ausencia de un deterioro visible no asegura que el alimento esté libre de la toxina botulínica (Thatcher et al., 1966). En carnes curadas Greemberg y col. (1959) observaron producción de toxina antes que se hiciera visible el deterioro y que a concentraciones de NaCl entre 7,09% y 9,95% se producía toxina sin producción de aromas desagradables. Montville (1983 a) observó que el pH del medio y la concentración de glucosa tenían un efecto marcado en el crecimiento, producción de gas y toxicidad del C. botulinum 62 A: en ausencia de glucosa disminuía notablemente la producción de gas y éste aparecía con notable retraso respecto de la aparición de tubidez. En la mayoría de los casos, para detectar la toxina de esta cepa (62A), cuando creció a pH bajo (5,0-5,25) fue necesario tripsinar las muestras. También encontró crecimiento y toxina en ausencia de producción de gas con las cepas B-aphis, CDC 17409 y 53B cultivadas a bajo pH en presencia de glucosa.

Se encontró toxina en ausencia de gas, en carnes curadas (Sofos et al., 1980), en papas envasadas al vacío e incubadas a

temperaturas subóptimas (Notermans et al., 1981), en alimentos acidificados (Townsend et al., 1954) y en procesos que utilizan esterilización por radiación y altas concentraciones de salmuera para inhibir el crecimiento de este microorganismo (Anderson et al., 1966; Thatcher et al., 1966).

El Clostridium botulinum puede crecer tanto en productos envasados como en chorizos, jamones u otros productos cárnicos. Sin embargo la tolerancia al oxígeno varía de un grupo a otro. Los del grupo I presentan la mayor tolerancia al oxígeno (hasta 7-9% O<sub>2</sub>); los del grupo III presentan menos tolerancia (3,8% O<sub>2</sub>). Pueden crecer y producir toxina si el potencial redox del medio de cultivo o el alimento es suficientemente bajo. Los tejidos animales y vegetales son aeróbicos mientras están vivos, pero al morir la provisión de oxígeno se detiene, los tejidos se hacen anaeróbicos y el potencial redox cae debido a la presencia de sustancias reductoras, permitiendo el crecimiento de C. botulinum.

En EEUU, los vegetales (tales como los porotos alubia hervidos, choclo, espinaca, espárragos, champignones, etc.) se han visto más implicados que los productos cárnicos. Sugii y Sakaguchi (1977) encontraron que los tipos A y B de Clostridium botulinum producían tanta toxina en un medio preparado con porotos alubia o champignones autoclavados en igual volumen de solución salina,



que en medios sintéticos. Para los tipos E y F era necesario agregar glucosa para obtener desarrollo en los vegetales hervidos. Además, las toxinas tipo A y B producidas en porotos alubia y champignones, tendían a ser de mayor tamaño molecular (16S y 19S principalmente), que aquellas producidas en cerdo o atún (principalmente 12S) (Sakaguchi, 1983).

### Germinación

Los requerimientos para la germinación de las esporas de C. botulinum son mucho menos restrictivos que los de crecimiento. La mayoría de las esporas puede germinar bajo condiciones en las cuales el crecimiento de las células vegetativas es imposible (Sperber, 1982). Según Baird-Parker y Freame (1967) el  $a_w$  mínimo necesario para la germinación de las esporas depende del soluto elegido para ajustar la actividad acuosa. En general el glicerol permite la germinación y el desarrollo a valores más bajos que con sales. Los tipos A, B y E mostraron germinación a un valor tan bajo de  $a_w$  como 0,93, pero no presentaron desarrollo en 6 semanas.

El mínimo valor para la germinación, a cualquier pH fue menor a 30°C que a 20°C tanto para el tipo A como el B. En cambio

la temperatura tuvo poco efecto sobre el E (Baird-Parker and Freame, 1967). Ando e Iida (1970) demostraron que las esporas del tipo E podían germinar a un potencial de óxido-reducción (Eh) de +414 mV, mientras que el desarrollo ocurría sólo si el Eh era inferior a +200 mV. El tipo E también mostró que podía germinar rápidamente a 2°C y 50°C, aunque no había desarrollo a esas temperaturas (Grecz and Arvay, 1982). De igual modo, se encontró que el tipo A germinaba a temperaturas muy lejanas a la máxima o mínima de desarrollo (Rowery and Feherry, 1970).

#### Temperatura de crecimiento

Las cepas proteolíticas de C. botulinum no crecen bajo buenas condiciones de refrigeración (por debajo de 10°C). Tanner y Oglesby (1941) estudiaron 17 cepas de C. botulinum tipos A y B y encontraron que todas crecían bien a 15°C, 5 a 10°C y ninguna a 5°C. Para el tipo A y las cepas proteolíticas del B la temperatura óptima de crecimiento es 37°C, con un desarrollo muy lento a 12,5°C y bastante rápido a 48°C, temperatura a la cual la toxina es lentamente inactivada (Ohye and Scott, 1953; Bonventre and Kempe, 1959; Smelt and Haas, 1978).

En cuanto a las cepas no proteolíticas, éstas crecen a

temperatura de refrigeración, por lo cual este método de preservación no es una garantía con respecto al botulismo. El tipo E y las cepas no proteolíticas de los tipos B y F pueden crecer y producir toxina a una temperatura tan baja como 3,3°C (Schmidt et al., 1961; Eklund and Poysky, 1965; Eklund et al., 1967 a y b; Roberts and Hobbs, 1968; Solomon et al., 1977; Solomon et al., 1982), sin embargo su temperatura óptima es aproximadamente 26°C (FDA, 1976).

El C. botulinum tipo G, cepa 89, creció a 12°C en caldo de cultivo y carne de cangrejo, pero no lo hizo a 8°C (Solomon et al., 1982).

Si bien las cepas no proteolíticas pueden crecer y producir toxina a temperaturas de refrigeración, sus esporas no resisten el proceso mínimo de pasteurización (Lynt et al., 1977, 1979).

#### Efecto del pH

El pH limitante para la germinación de las esporas, el crecimiento y la producción de toxina para los tipos A y B fue investigado en un variado número de alimentos y medios de cultivo (Dozier, 1924; Ingram and Robinson, 1951; Townsend et al., 1954; Ohye and Christian, 1966; Baird-Parker and Freame, 1967; Hauschild



et al., 1975; Huhtanen et al., 1976; Ito et al., 1976). Esos estudios y otros, establecieron que las esporas de C. botulinum no pueden germinar, crecer ni producir toxina si el pH del medio es inferior a 4,6. Puesto que en los alimentos ácidos se confía en el pH, para prevenir el desarrollo y producción de toxina por el C. botulinum, los procesos térmicos de estos alimentos no fueron diseñados para destruir las esporas de este anaerobio (Odlaug and Pflug, 1977).

Con respecto al tipo E, Segner y col. (1966) encontraron que el mínimo pH que permitía el desarrollo era 5,2-5,3. Lerke (1973) obtuvo desarrollo en cocktail de cangrejo a pH 4,95 pero no a 4,86.

A pesar de los estudios que informan un pH de 4,6 como el límite de desarrollo para el C. botulinum, periódicamente ocurren casos de botulismo en conservas caseras ácidas (CDC, 1974 a y b). Además varios investigadores encontraron desarrollo a pH inferior a 4,6: Odlaug y Pflug (1979) en jugo de tomate al que inocularon esporas de Aspergillus gracilis; iguales resultados obtuvieron Huhtanen et al. (1975) en condiciones semejantes, debido a una elevación del pH junto al micelio del hongo (en algunos casos llegaba hasta 8,2); Amato de Lagarde y Beerens (1970) en peras y duraznos en almíbar cuyo pH fue incrementado a 4,8-5,1 por desarro-



llo de Trichosporon sp., y a pH inferior obtuvieron desarrollo sin producción de toxina. Raatjes y Smelt (1979) observaron el crecimiento y producción de toxina en medios homogéneos ricos en proteína (conteniendo 3% o más de soja o proteína de leche) a un pH tan bajo como 4,0 y que el efecto inhibitor de varios ácidos a igual pH se incrementaba en el siguiente orden: HCl < cítrico < láctico < acético.

Tanaka (1982 b) encontró crecimiento a pH 4,24-4,40 con los tipos A y B, en presencia de grandes cantidades de proteína precipitada y postuló que se debía a la presencia de microzonas de mayor pH dentro de la matriz de la proteína.

Aún es correcto pensar que Clostridium botulinum no va a desarrollar a valores de pH inferiores a 4,6, a menos que haya aumentos locales producidos por levaduras, hongos o el agregado de proteínas. Probablemente el botulismo no ha sido un problema más difundido en alimentos de alta acidez, pues no es común que esos alimentos tenga abundancia de proteína precipitada (Sperber, 1982).

#### Influencia de la actividad de agua

La aplicación del concepto de actividad de agua a las re-

laciones acuosas de los microorganismos hace una suposición importante: cuando la solución acuosa del ambiente del microorganismo se concentra por la adición de solutos o por la remoción de agua, las consecuencias para el crecimiento microbiano son debidas exclusivamente a los cambios de  $a_w$  (Christian, 1981). Los primeros investigadores de las relaciones acuosas de C. botulinum determinaron el contenido de humedad de los alimentos y no el  $a_w$  (Sperber, 1982).

Los valores mínimos de la actividad de agua para el crecimiento de los tipos más frecuentes en el botulismo humano se resumen en la Tabla 8.

Baird-Parker y Freame (1967) estudiaron la influencia de la actividad de agua, pH y temperatura en la germinación, crecimiento y desarrollo de los tipos A, B y E, usando NaCl y glicerol. El glicerol actuaría como "solute compatible" permitiendo el desarrollo a valores bastante inferiores a los que se alcanzan con otros solutos tales como NaCl (Sperber, 1982). Estos resultados pueden verse en la Tabla 9.

Emodi y Lechowich (1969) encontraron que el mínimo  $a_w$  para el crecimiento del tipo E variaba entre 0,972 y 0,978, usando una amplia gama de solutos.

Es de una gran importancia el uso de varios factores, en

Tabla 8: Mínimos valores de  $a_w$  para el crecimiento de C. botulinum  
en medios ajustados con NaCl

<u>C. botulinum</u> tipo	mínima $a_w$	Referencia
A y B	0,96	Baird-Parker and Freame (1967)
	0,95	Denny et al. (1969)
	0,95	Scott (1957)
	0,94	Ohye and Christian (1966)
	0,94	Marshall et al. (1971)
E	0,972	Emodi and Lechowich (1969)
	0,97	Baird-Parker and Freame (1967)
	0,97	Ohye and Christian (1966)
G	desconocido	

Tabla 9: Mínimo  $a_w$  que permite el crecimiento de C. botulinum tipos A, B y E a pH 7,0 y 5,5 (Baird-Parker and Freame (1967))

Soluto	C. botulinum tipo	pH 7,0		pH 5,5
		<u>Mínimo <math>a_w</math> para:</u>		
		Crecimiento	Germinación	Crecimiento
NaCl	A y B	0,96	0,93	0,97
	E	0,97	0,93	0,99
Glicerol	A y B	0,93	0,89	0,95
	E	0,95	----	----



combinación con la actividad de agua, para inhibir el crecimiento de C. botulinum. El mayor énfasis se ha hecho en la interacción nitrito- $a_w$ , y también pH y temperatura. Los resultados de Roberts e Ingram (1973) son un excelente ejemplo de tales combinaciones (Figura 3). Smoot y Pierson (1979) y Lund y Wyatt (1984) estudiaron la interacción del % NaCl con el potencial redox y encontraron una profunda influencia entre ellos. Hauschild y Hilsheimer (1979) inhibieron el crecimiento de los tipos A, B y E en caviar a temperatura ambiente.

Montville (1983 b) estudió la relación entre el  $a_w$  y el pH y su efecto en el desarrollo y lisis celular. La lisis se vio afectada sólo por el pH (disminuyendo al reducirse el pH).

El desarrollo en condiciones de  $a_w$  y pH restrictivas según Montville (1984), es atribuido sólo a una pequeña subpoblación del total de esporas inoculadas.

#### Botulismo humano

Puede clasificarse en cuatro tipos: por intoxicación alimentaria, por heridas, botulismo del lactante e indeterminado (CDC, 1979). En este último tipo se clasifican todos los casos en que no es detectado el origen de la toxina. Se considera que

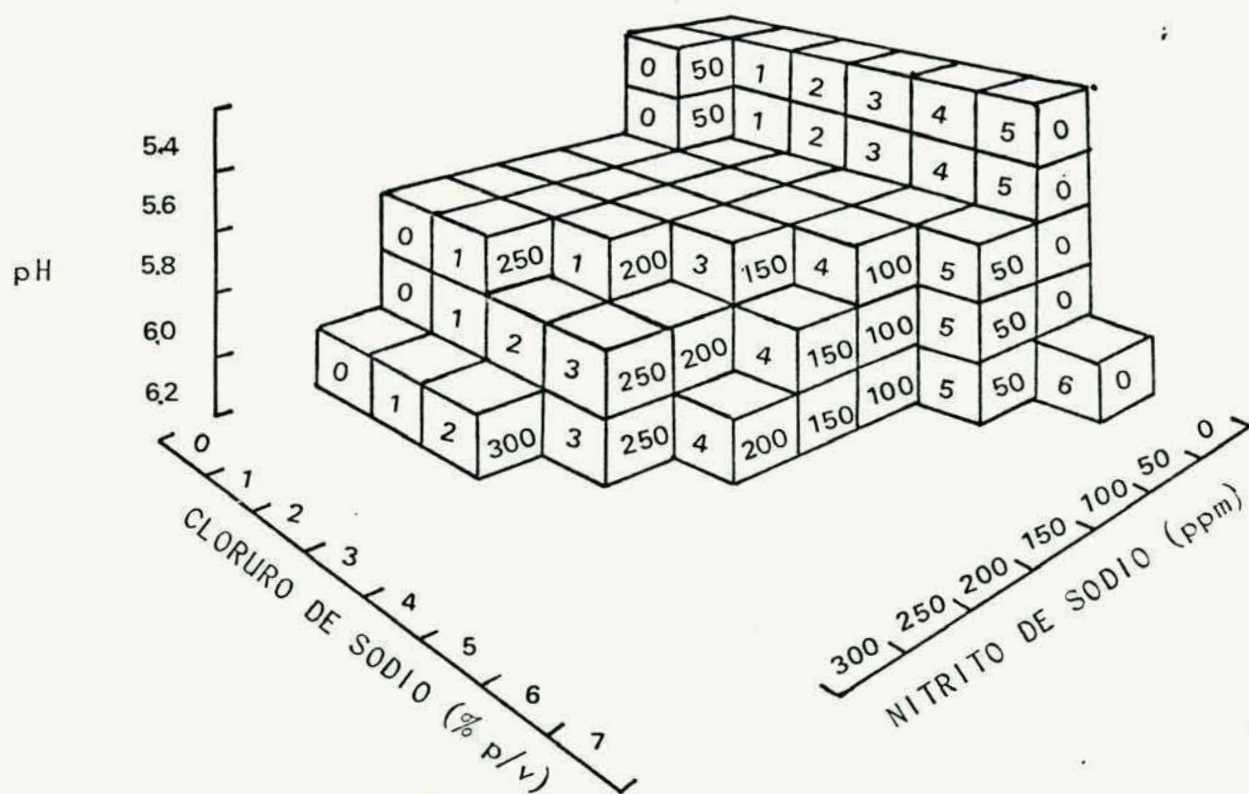


Figura 3: Efecto del pH, cloruro de sodio y nitrito de sodio en el crecimiento del Clostridium botulinum tipo B a 35°C (de Roberts e Ingram, 1973).

en algunos de este tipo la toxina debe haber sido producida en el intestino del paciente como en el botulismo infantil (Sakaguchi, 1983). Se pudo aislar Clostridium botulinum tipo G, de la necropsie de cuatro adultos y un niño de 18 semanas que murieron súbita e inesperadamente. Su toxina se encontró en el suero de dos de los adultos y en el niño. El tipo B y el A también se encontraron en autopsias de otros cinco cadáveres de personas que murieron súbita e inesperadamente (Sonnabend et al., 1981).

#### Botulismo causado por alimentos

Es el tipo más común y se debe a la ingestión de la toxina, preformada en el alimento. Los casos de adultos son principalmente de este tipo. Generalmente se intoxican varias personas al mismo tiempo por consumir toxina de una misma fuente. Los serotipos más frecuentemente involucrados son el A, B y E. En EEUU, en el período 1899-1977, de los 766 brotes registrados, 26,0% era tipo A, 7,8% tipo B, 4,2% tipo E, 0,1% tipo F y 0,1% tipos A y B combinados. El 61,6% no fue determinado. Hasta mediados de siglo la mortandad era muy elevada en los casos de intoxicación, pero ésta ha disminuído notablemente gracias a la mejora en el tratamiento respiratorio y de apoyo, y a la rápida administración de la anti-



toxina (CDC, 1979).

En nuestro país en el período 1922-1957 se registraron 9 brotes con 44 casos y una letalidad del 88,6%, causados en su totalidad por alimentos caseros (Ciccarelli et al., 1982). Es importante mencionar que hasta 1957 el diagnóstico y denuncia de brotes se hacía sólo esporádicamente. Recién a partir de 1958 se hizo en forma sistemática (al menos para adultos ya que para lactantes aún continúa el déficit). En el período 1958-1976 se registraron 28 brotes con 104 casos y 34,6% de letalidad. El 28,6% de los brotes fueron por alimentos de elaboración industrial, 60,7% por alimentos y conservas caseras, y en el 10,7% no se registró el origen (Amato de Lagarde, 1976). En el período 1977-1985 se registraron 19 brotes con 64 casos y una letalidad del 29,8%. De ellos el 5,2% fue por conservas industriales, el 15,8% por conservas regionales comercializadas y el 73,7% por conservas caseras (Amato de Lagarde, 1985; Vega de Pérez, 1982; Giménez et al., 1982).

Hasta 1977 la totalidad de los brotes fueron causados por Clostridium botulinum tipo A. En el período siguiente se registró un caso de botulismo A<sub>f</sub> en Mendoza por consumo de trucha en escabeche (Giménez et al., 1985), otro tipo B en el cual el alimento involucrado fueron albóndigas caseras (Amato de Lagarde, 1985) y



un caso del tipo E en el cual se encontró la toxina en el suero del paciente pero no se dispuso del alimento ni heces del paciente para su análisis (Amato de Lagarde, 1985).

### Síntomas de la intoxicación botulínica

El período de incubación es muy variable, pero en general se considera de 18 a 36 horas. En casos de intoxicación por el tipo E han aparecido síntomas entre 6 horas y 8 días. En general los períodos de incubación cortos son acompañados por una elevada mortandad ya que ésta se debe a una elevada ingestión de toxina. Los casos de intoxicación con B y E, comienzan con náuseas y vómitos (lo que explicaría una menor mortandad) mientras que en los del A son menos frecuentes los síntomas gastrointestinales. Pero ocurren muchas veces por "asociación" bacteriana o presencia de otras toxinas (enterotoxina estafilocócica). El botulismo humano como consecuencia de la infección de heridas no presenta vómitos, náuseas o diarrea sino que se limita a los síntomas neurológicos.

En general los primeros síntomas neurológicos son alteraciones de la visión con pérdida del reflejo a la estimulación luminosa (midriasis), diplopia e incapacidad de acomodación para

visión cercana, parálisis de los músculos faríngeos con dificultad para hablar y deglutir, aturdimiento, hipotensión postural y parálisis muscular simétrica y progresiva. Con frecuencia los síntomas neurológicos son precedidos por vómitos, náuseas, retortijones y diarrea. Generalmente surge constipación luego que surgen los signos neurológicos. Las mucosas de la boca, lengua y faringe generalmente están secas.

Los puntos importantes que habría que recalcar son:

- ausencia de fiebre
- lucidez (el sistema nervioso central funciona normalmente)
- el pulso es normal o algo bajo
- las manifestaciones neurológicas son simétricas

La forma más efectiva y eficiente de confirmar en el laboratorio, el diagnóstico clínico, es demostrar la presencia de toxina en el suero del paciente o en las heces. El aislamiento de C. botulinum a partir del alimento y de las heces del paciente en cantidad significativa puede ayudar a apoyar el diagnóstico clínico. El análisis de los alimentos involucrados es especialmente útil para determinar la fuente de contaminación (CDC, 1979).

El tratamiento del botulismo se dirige fundamentalmente a

///

los siguientes puntos:

- 1) La toxina circulante debe ser neutralizada con la antitoxina tan pronto como sea posible.
- 2) La toxina que no ha sido absorbida en el tracto gastrointestinal debe eliminarse rápidamente.
- 3) Debe evitarse la parálisis general progresiva especialmente de los músculos respiratorios (FDA, 1976; Smith, 1977).
- 4) Debe aplicarse un tratamiento sintomático adecuado para evitar complicaciones por infecciones agregadas, fallas cardiovasculares, desequilibrio del medio interno, ulceración de córnea, etc.
- 5) En caso de botulismo del lactante y por heridas por el tratamiento antibiótico correspondiente.

#### Botulismo del lactante

Fue reconocido por primera vez en 1975, aunque puede no ser una enfermedad nueva. Se presenta sólo en niños de 3 semanas a 8 meses de edad. Se considera que los lactantes ingieren esporas viables, que pueden germinar, proliferar y producir toxina en algún lugar del tracto digestivo. El concepto de que el C. botulinum



puede multiplicarse en el intestino no es nuevo. El hallazgo del organismo y su toxina en las heces de un paciente 32 días después del comienzo de la enfermedad, tiempo suficiente como para que los materiales ingeridos hubiesen sido excretados o inactivados es una prueba de ello. De todos modos no hay aún pruebas suficientes de que los adultos puedan desarrollar botulismo por comer alimentos, tales como vegetales crudos, que ocasionalmente pudieran tener esporas de C. botulinum pero no la toxina (Sugiyama, 1980).

El estudio con ratones, mostró que eran susceptibles a la colonización intestinal botulínica, cuando se los alimenta con esporas, si tienen entre 8 y 14 días de edad, pero no si son mayores o menores. Los estudios con ratas y ratones sostienen la teoría de que el botulismo del lactante se debería a un problema de "ecología microbiana". La microflora intestinal de los individuos mayores de 14 días probablemente incluye una o más especies actuando solas o en conjunto, y evitando el desarrollo de C. botulinum. Los lactantes serían susceptibles debido a que la barrera microbiana antibotulínica aún no se ha desarrollado o ha sido desplazada. Puesto que los ratones libres de gérmenes (axónicos) menores de una semana no pueden ser infectados, su resistencia se debería a otros factores (Sugiyama, 1980).

Hasta 1981 en EEUU se produjeron al menos 188 casos, 3 en

Australia y varios en Inglaterra, Checoslovaquia y Canadá (Sakaguchi, 1983). En Argentina se han registrado 7 casos hasta la fecha, seis de los cuales resultaron fatales.

La tríada diagnóstica de la enfermedad es: constipación, hipotonía y reflejo fotomotor disminuído. Se produce un estado de letargia e indiferencia; es especialmente notable la hipotonía en los músculos del cuello.

En todos los casos, el diagnóstico se estableció por la identificación de C. botulinum en las heces del paciente y la toxina en las heces y/o el suero.

#### Clostridium botulinum tipo G

Este nuevo tipo de Clostridium botulinum fue aislado por primera vez, por Giménez y Ciccarelli en 1969 en la provincia de Mendoza, al realizar un estudio sobre la distribución de Clostridium botulinum en el suelo de Argentina. Recientemente Sonnabend y col. (1981) lo identificaron junto con su toxina, a partir de muestras obtenidas de necropsias de cinco cadáveres humanos. Dichas muertes "súbitas e inesperadas" carecían de diagnósticos y no habían sido relacionadas con ningún tipo de botulismo.

Existe poca información sobre Clostridium botulinum tipo G.



Giménez y Ciccarelli (1970 b) encontraron que una muestra de suelo, al inocularla en caldo de cultivo, producía un bajo título de toxina (30 DL<sub>50</sub>, ratón/ml) y que ésta no se neutralizaba con ninguno de los tipos de antitoxina conocidos (A a F). El microorganismo aislado (cepa 89) fue descrito por Giménez y Ciccarelli (1970 b) como un bacilo anaerobio, móvil, Gram positivo (aunque se decolora fácilmente), que produce esporas subterminales. Las colonias que obtuvieron en agar sangre de conejo eran de 1-2 mm de diámetro, de bordes irregulares ondulados o reticulados y con la superficie rugosa o lisa dependiendo del tamaño de la colonia y rodeadas de una zona de hemólisis. En cuanto a su comportamiento bioquímico es asacarolítico; produce H<sub>2</sub>S, es débilmente proteolítico, licúa la gelatina y es lipasa y lecitinasa negativo.

Posteriormente, Ciccarelli y col. (1977) caracterizaron la cepa 89 del Clostridium botulinum tipo G desde el punto de vista cultural, bioquímico y toxigénico. La dosis letal para monos, resultó de 33.000 y 120 DL<sub>50</sub>, ratón/kg, por vía intragástrica y endovenosa respectivamente; para cobayos 10.000 a 20.000 y 100 DL<sub>50</sub>, ratón/kg por vía intragástrica e intraperitoneal respectivamente, y para pollos 3.125 y 1.200 a 2.600 DL<sub>50</sub>, ratón/kg según fuera por vía oral o subcutánea. Los efectos de la toxina fueron iguales sino idénticos, a los observados con los otros tipos



de toxinas botulínicas. Los ensayos con perros y corderos demostraron que no son sensibles a la toxina.

Sonnabend y col. (1981) obtuvieron 19 aislamientos de Clostridium botulinum tipo G, en las muestras de 5 necropsias. Además se encontró toxina en el suero de tres de los cadáveres. No pudieron sin embargo obtener muestras de los alimentos ingeridos con anterioridad al deceso, y tampoco hallaron el microorganismo en muestras de suelo tomadas en la vecindad de los hogares de los pacientes.

La electroforesis de la toxina purificada del C. botulinum tipo G, en gel de dodecil sulfato-poliacrilamida, mostró que contenía dos polipéptidos. La proteína predominante posee un peso molecular de 150.000 y se supone que es la toxina. El peso molecular de la segunda fracción es levemente menor (Lewis et al., 1981).

Giménez y Ciccarelli (1970) y Ciccarelli y col. (1977) señalaron la baja producción de toxina en los medios normales de cultivo y además no observaron esporas en las coloraciones realizadas sobre extendidos de medios líquidos y sólidos. Solomon y Kautter (1979) estudiaron las condiciones óptimas de producción de toxina y de esporulación de la cepa 89. Compararon la esporulación en cuatro medios líquidos y uno sólido, y la producción de toxina en varios medios líquidos. Los cultivos en TPGY (Tryp-

ticase, peptona, glucosa, extracto de levadura) con 0,4 o 0,1% de glucosa no condujeron a la producción de esporas; en cambio la máxima esporulación la obtuvieron en AA, (agar anaeróbico en superficie;  $\approx 10^7$  esp./ml) y en CMM (Cooked Meat Medium, deshidratado;  $\approx 10^6$  esp./ml). En BHI (infusión cerebro corazón) fue  $10^5$  esp./ml. En AA la esporulación fue completa con pocas o ninguna célula presente. La temperatura no mostró ningún efecto cuando la variaron entre 26 y 35°C.

En cuanto a la producción de toxina por el tipo G parece verse afectada por el tiempo y la temperatura de incubación. Los resultados de Solomon y Kautter (1979) mostraron una producción mayor a 26°C que a 30 o 35°C, obteniendo un título de  $10^3$ - $10^4$  DLM/ml a 26°C para los distintos medios (estos valores se obtuvieron activando la toxina con tripsina). La activación con tripsina potencia su toxina entre 100 y 1000 veces, como ocurre con las cepas no proteolíticas de los tipos B, E y F (Giménez and Ciccarelli, 1970; Ciccarelli et al., 1977; Solomon and Kautter, 1979; Duff et al., 1956; Holdeman and Smith, 1965).

Lynt y col. (1984) estudiaron la resistencia térmica de las cepas 89 y 2739 de Clostridium botulinum tipo G y encontraron para cada una, dos tipos de esporas, una resistente a altas temperaturas y otra que se destruía fácilmente a 80°C. Los valores



de  $\underline{D}$  (tiempo de reducción decimal) de las más lábiles de la cepa argentina, aunque levemente más elevados, se asemejan a los de las cepas no proteolíticas de los tipos E y F (Cockey and Tatro, 1974; Lynt, Kautter and Solomon, 1979; Lynt et al., 1977; Ohye and Scott, 1957; Roberts, Ingram and Slulberg, 1965). Los de la cepa suiza son intermedios entre éstos y los de las cepas proteolíticas A, B y F. Sin embargo, los valores de  $\underline{z}$  (pendiente de la curva de muerte térmica) para las esporas menos resistentes de ambas cepas, son tan elevados como los de los otros tipos proteolíticos de Clostridium botulinum o más (Lynt, Kautter and Solomon, 1981; Schmidt, 1964; Stumbo, 1973; Stumbo, Murphy and Cochran, 1950). Las curvas de destrucción térmica de las esporas más resistentes de las dos cepas, son similares. Los valores de  $\underline{D}$ , particularmente a las temperaturas más bajas, son algo inferiores, a los informados para las esporas de los otros tipos proteolíticos de Clostridium botulinum (Ito et al., 1967; Odlaug and Pflug, 1977; Odlaug, Pflug and Kautter, 1978). La extrapolación de esas curvas da valores de  $D_{250}$  muy cercanos a los de las otras cepas proteolíticas, pero la extrapolación a temperaturas más elevadas da valores de  $\underline{D}$  mucho mayores para el tipo G que para las otras cepas proteolíticas de Clostridium botulinum (Lynt et al., 1984).



## CONSERVADORES QUIMICOS

Los conservadores le ofrecen beneficios inmediatos al consumidor, al productor y a la sociedad, pues permiten almacenar los productos por tiempos más prolongados, disminuir pérdidas y costos, y minimizar el riesgo para la salud.

El conservador ideal debe ser capaz de inhibir el desarrollo de hongos, levaduras y bacterias. No debe ser tóxico ni carcinogénico para los animales de prueba ni para los humanos. Debe ser metabolizado en el cuerpo y no sujeto a un proceso de desintoxicación en el hígado. No deben almacenarse sus residuos en el tejido graso. Idealmente debería ser soluble en agua ya que los microorganismos crecen en la fase acuosa de los alimentos. Debería ser estable en el alimento, no tener olor o sabor y ser económico. Ha sido bastante difícil hallar compuestos que posean un amplio rango de acción antimicrobiana, sean económicos y posean una baja toxicidad.

Evidentemente, ningún antimicrobiano es ideal para todos los alimentos ni todas las condiciones de almacenaje. Cuatro son los grupos de conservadores químicos más usados: los parabenos (ésteres alquílicos del ácido p-hidroxibenzoico), los benzoatos, propionatos y sorbatos. También son muy usados los ácidos acéti-

co, cítrico y málico, los antioxidantes fenólicos BHA (butil hidroxitolueno, aunque este último se suspendió su uso hasta completar los ensayos de carcinogénesis en ratas), nitrito (de sodio y potasio) y sulfitos (que incluye  $\text{SO}_2$ , sulfitos, bisulfito y metabisulfito) (Robach, 1980).

### Sorbato

El ácido sórbico fue descubierto por primera vez en 1859, por reacción de álcali fuerte con aceite de baya de fresno y su nombre deriva del de la planta (*Sorbus aucuparia* Linné). Se lo sintetizó por primera vez en 1900 y aproximadamente en 1940 se describieron sus propiedades antimicrobianas. A partir de 1950 se lo comenzó a producir industrialmente (Sofos et al., 1979 b).

Su estructura química es el isómero trans-trans del ácido 2,4 hexadieno y su fórmula es:



Su solubilidad en agua fría es relativamente baja (0,16%) y se disuelve más fácilmente en agua caliente y en alcoholes (es-

///

pecialmente etanol). La solubilidad se incrementa con el pH y la temperatura (Tabla 10). La presencia de componentes solubles en los alimentos tales como glucosa, sacarosa, NaCl y otros reducen su solubilidad en agua, incrementando la relación sórbico en aceite/sórbico en agua de 3,0 hasta casi 5,0.

El oxígeno molecular ataca las dobles ligaduras del ácido sórbico, pero en la práctica esto es insignificante. Tanto el sórbico como sus derivados, son notablemente estables frente a la oxigenación, cuando están puros (Lück, 1976).

Para incorporar el ácido sórbico en materiales secos, primero debe mezclarse con sal, harina o almidón de maíz. Para disolverlo en líquidos puede ser solubilizado con hidróxido de sodio o potasio, o también en propilenglicol o etanol cuando se lo va a usar rociado en "spray" o para sumergir el producto. En alimentos que reciben prolongados calentamientos (como las jaleas) debe ser agregado al finalizar el proceso (Chichister and Tanner, 1972).

A diferencia del ácido sórbico, el sorbato de potasio (SK) es muy soluble en agua (58%) y casi el doble que el sorbato de sodio (aproximadamente 28%).

Sus aplicaciones son muy variadas e incluyen alimentos (para hombres y animales), medicamentos, cosméticos y materiales



Tabla 10: Solubilidad del sorbato (%) (Sofos and Busta, 1981)

Solvente	Acido sórbico	Sorbato de potasio
agua (25°C, pH 3,1)	0,16	58,20
agua (25°C, pH 4,4)	0,22	-----
agua (25°C, pH 5,9)	1,02	-----
agua (100°C)	4,00	64,00
aceite (20°C)	1,00	0,01
aceite (100°C)	10,00	0,19

para embalaje. Como conservador de alimentos lo podemos encontrar en alimentos lácteos (queso y subproductos, yoghurt, crema ácida, quesos para untar), productos de panadería (desde tartas y tortas hasta cremas de chocolate y coberturas), frutas y derivados (vinos, jugos, jarabes, dulces, salsas, vegetales fermentados) y otros productos tales como ciertos tipos de carnes y pescados, mayonesa, margarina y salsas (Sofos and Busta, 1981).

#### Efectos fisiológicos

El ácido sórbico es metabolizado en el cuerpo en forma similar a otros ácidos grasos. Sólo se omite el primer paso de la  $\beta$ -oxidación pues ya posee en posición  $\alpha$ - $\beta$  una doble ligadura.

Las particularidades de la desintegración se observaron usando ácido sórbico marcado con carbono 14. Se vio que es absorbido cuantitativamente en el intestino y el 85% se oxida en pocas horas. El período de vida media en el cuerpo es de 40 a 110 minutos, dependiendo de la dosis. Los animales domésticos a los que se suministraron piensos conteniendo ácido sórbico, no mostraron residuos de éste ni en la carne de sus músculos ni en sus órganos internos. Los ensayos realizados muestran que es totalmente oxidado a  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$  y aprovechado calóricamente por el organismo

(Lück, 1976; Sofos et al., 1979 b).

Deuel y col. (1954) encontraron que es inocuo para perros y ratas cuando se incorpora hasta un 5% en la dieta, y su toxicidad es menor que la del benzoato que debe ser eliminado en hígado.

La toxicidad aguda del ácido sórbico ( $DL_{50}$ ) es de unos 10 g/kg de peso corporal. Como comparación debe citarse que la  $DL_{50}$  del NaCl es de unos 5 g/kg de peso corporal y que además éste se agrega a los alimentos en una cantidad mucho mayor. Con respecto a la toxicidad aguda es el conservador más inofensivo que se conoce (Lück, 1976). Tanto el ácido sórbico como el sorbato de potasio pertenecen a la lista GRAS de la FDA ("Generalmente recomendados como seguros") debido a la muy baja toxicidad aguda o crónica. Esto fue confirmado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) que estipuló como ingesta diaria 25 mg/kg de peso corporal y de todos los conservadores es la más elevada (Sofos et al., 1979 b). La cantidad realmente consumida de ácido sórbico se halla establecida en la mayoría de los países y es sólo una fracción de los valores tolerables (Lück, 1976).

#### Efecto antimicrobiano

El sorbato es principalmente fungistático pero actúa tam-



bién contra bacterias, aunque su efecto no es tan amplio como contra hongos y levaduras.

El efecto antimicrobiano depende del pH del sustrato ya que sólo es efectivo el ácido sórbico libre no disociado, por lo tanto su actividad se incrementa a medida que baja el pH. En la Tabla 11 vemos el efecto del pH sobre la concentración efectiva del ácido sórbico. En ella podemos observar que es más efectivo en alimentos ácidos, y que su límite de actividad sería entre pH 6,0-6,5.

Los estudios sobre la acción del ácido sórbico o sus sales son innumerables y no conducen a un mecanismo único de acción sobre los microorganismos. Los diferentes resultados hallados hasta la fecha fueron obtenidos con cepas particulares de microorganismos o con sistemas enzimáticos aislados. Esto sugiere que no existe un mecanismo de acción único del sorbato, sino más bien una serie de factores que producen la inhibición por sorbato; la variedad de enzimas afectadas, y la variabilidad de los resultados obtenidos entre grupos, especies y aún cepas de la misma especie, confirman esta especulación.

Quedan además muchas preguntas sin responder, tales como de qué manera difiere el efecto del sorbato en hongos, levaduras y bacterias, entre esporas y formas vegetativas, entre bacterias

Tabla 11: Efecto del pH en la disociación del ácido sórbico  
(Blocher et al., 1982)

pH	% de ácido sórbico no disociado
7,00	0,6
6,00	5,6
5,90	6,9
5,80	8,5
5,70	10,5
5,60	12,9
5,50	15,7
5,00	37,0
4,75 ( $pK_a$ )	50,0
4,40	70,0
4,00	86,0
3,70	93,0
3,00	98,0

gram-positivas y gram-negativas, en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, en medios de laboratorio o en alimentos (Sofos and Busta, 1981). Es evidente que aún queda mucha investigación básica por realizar para explicar estos efectos.

Los niveles de ácido sórbico incorporados en alimentos en EEUU, pueden verse en la Tabla 12.

Es importante mencionar que tanto las bacterias como los hongos y levaduras no desarrollan resistencia al sorbato, como ocurre con los antibióticos (Lück, 1976).

#### Efecto antibotulínico del sorbato de potasio

Durante décadas se ha usado nitrito en la preservación de carnes curadas, para evitar la formación de toxina botulínica. Sin embargo en los últimos tiempos la Secretaría de Agricultura de los EEUU ha recomendado la disminución de los niveles usados en algunos productos o su total eliminación en otros. Por ese motivo surgió la necesidad de buscar algún suplemento o reemplazante en los productos a base de carnes curadas. La atención se fijó en sorbato de potasio a partir de un estudio de Tompkin et al. (1974) que lograba incrementar dos veces y medio el tiempo de almacenaje de salchichas cocidas sin curar, a 27°C, inoculadas con esporas de



Tabla 12: Niveles de ácido sórbico utilizados en diversos  
alimentos en EEUU (Sofos and Busta, 1981)

Producto	ácido sórbico
	% (P/P)
quesos	0,05-0,30
vinos	0,01-0,04
frutas secas	0,02-0,05
productos de panadería	0,03-0,10
salsas	0,05-0,10
pescado	0,03-0,15
mayonesa	0,10

Clostridium botulinum. También se encontró igual efecto inhibidor en salchichas tipo "frankfurter" con carne de pollo, conteniendo 156 ppm de nitrito que con 0,20% de ácido sórbico. La combinación de ambos incrementaba de 4 a 10 veces el tiempo de deterioro a 27°C (Sofos et al., 1979 c) pero ninguna lo evitó. El pH de las muestras variaba entre 5,8-6,4. Similares resultados obtuvieron Ivey y Robach (1978), Ivey et al. (1978), Tanaka et al. (1977), Robach et al. (1978) y Sofos et al. (1979 d). Generalmente las combinaciones nitrito-sorbato han sido más efectivas en retardar el crecimiento y producción de toxina que cuando se las usa solas. Sin embargo Sofos et al. (1979 a) no observaron retraso en la producción de toxina en emulsiones cárnicas para salchichas cuando usaban proteína de soja texturizada con 0,2% de ácido sórbico, además el efecto inhibidor era menor en emulsiones a base de carne de pollo, que con otros tipos de carne.

Tanaka et al. (1977) probó un sistema a base de carne de cerdo macerada con nitrito, sorbato, pirofosfato ácido de sodio (SAPP), pH y sal. El sorbato no mostró un efecto notable a pH 6,3 pero sí a pH 5,5. La adición de nitrito a las muestras con SK y/o SAPP incrementó notablemente el efecto inhibidor. La combinación de SK y SAPP presentó mayor efecto que cada uno por separado.

Huhtanen et al. (1981) halló una protección casi total con

ácido sórbico (0,13-0,38%) en jamones preparados sin nitrito (pH 5,5-5,7), almacenados 6 meses a 30°C.

El efecto inhibidor del SK se incrementa a menor  $a_w$  y pH y cuando el almacenaje es a baja temperatura (Roberts et al., 1982). Sin embargo existirían además otros factores que influyen en el desarrollo del Clostridium botulinum ya que Blocher et al. (1982) encontró que distintas suspensiones de esporas de una misma cepa, a igual pH tenían diferente sensibilidad al SK. Esto podría deberse a diferencias en las condiciones de esporulación ya que no hay en este caso diferencia de información genética.

La germinación de las esporas del C. botulinum tipo E se inhibió casi por completo con 1,0; 1,5 o 2,0% de SK a pH 5,8-6,0. A pH 7,0-7,2 en presencia de 1,0-2,0% de SK o 0,5-1,0% de hipofosfito, se produjo desarrollo de células anormales con defectos en su división celular (Seward et al., 1982).

Estos resultados sobre su efecto inhibidor y otros muchos que figuran en la bibliografía, no sólo para C. botulinum sino para otros microorganismos, unido a su no toxicidad, su completo metabolismo vía degradación de los ácidos grasos dentro del cuerpo y al rango de pH relativamente amplio en el cual es efectivo hacen de esta sustancia un conservador cercano a la idealidad, para muchos alimentos.

///



PARTE I

EFFECTO DEL SORBATO DE POTASIO EN LA PRODUCCION DE TOXINA  
POR Clostridium botulinum TIPO A EN UN SISTEMA MODELO DE  
QUESO FUNDIDO

## MATERIALES Y METODOS

### El microorganismo

La cepa INM 9 de Clostridium botulinum tipo A fue cedida por la Dra. Amato de Lagarde (Bacteriología Sanitaria, Insituto Nacional de Microbiología, Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina) y fue la que se usó en todos los experimentos.

### Preparación de la suspensión de esporas

El microorganismo se cultivó en el medio Tarozzi a 32°C. Se cosecharon las esporas cuando el cultivo estuvo abundantemente esporulado (aproximadamente 14 días). Para ello primero se disgregó las partículas de carne para liberar las esporas y luego se las eliminó haciendo una centrifugación a bajas RPM. A continuación se hicieron 6 centrifugaciones sucesivas a 3000 RPM durante 15-20 minutos cada una (en una centrífuga no refrigerada), lavando el precipitado de esporas con solución fisiológica (NaCl 0,85% p/p). El cuarto lavado se realizó con etanol para eliminar las formas vegetativas. Finalmente las esporas se suspendieron en una solución estéril de NaCl 5% p/p ( $a_w$  0,970) y se guardaron refrigeradas en

la oscuridad (a 4-6°C).

#### Preparación del medio Tarozzi

Se deja una noche en maceración, un kg de carne picada bien magra, en 1,5 l de agua (en la heladera). Luego se hierve 30 minutos y se filtra. Al filtrado se le agrega 2,0% de peptona bacteriológica (Difco) y 0,4-0,5% de NaCl. El pH se ajusta a 7,2-7,3 y se autoclava una hora a una atmósfera. Se vuelve a filtrar para eliminar todas las proteínas que precipitan obteniéndose un líquido límpido que se fracciona a razón de 10 ml/tubo de ensayo. A cada tubo se le agrega la carne picada, extraída y escurrida (aproximadamente 10-15% del volumen de caldo). Por último se vuelve a autoclavar 20 minutos a 120°C.

#### Sistemas modelo

El sistema modelo se preparó de la siguiente forma: En todos los experimentos se usó un medio base conteniendo 25 g de tripticase (BBL Microbiological Systems), 5 g de extracto de levadura (Difco Lab., Detroit, Michigan), 5 g de glucosa y 0,5 g de clorhidrato de L-cisteína (Mallinckrodt Chem. Works, St. Louis)



en 1000 g de agua destilada. Para ajustar la actividad de agua del medio base se usaron las siguientes sustancias: NaCl (Merck, Darmstadt, West Germany), lactato de sodio (BDH Chemicals Ltd., Poole, England), sal emulsificante Ioha S-9 (mezcla de polifosfatos y otras sales; (Meyer, 1973)) (Química Hoeschst, Buenos Aires, Argentina) y caseína (Sancor Coop. Lecheras, Buenos Aires, Argentina) para semejar más la estructura del queso. La actividad de agua del medio base es 0,996 (Briozzo et al., 1983) y se redujo a 0,974 o 0,967 regulando la concentración de los solutos mencionados. La cantidad a agregar de esas sales para obtener un nivel determinado de  $a_w$  se calculó en base a los datos de la bibliografía sobre su efecto reductor del  $a_w$ : los valores para NaCl se obtuvieron de Robinson y Stokes (1965); los de lactato de Chirife y Ferro Fontán (1980) y los de la sal Ioha S-9 de Briozzo (1982). La corrección por la actividad de agua del medio base (Briozzo et al., 1983) se hizo por medio de la ecuación de Ross (1975) (ec. 15 ). También se determinó la actividad de agua de cada medio después de la esterilización y siempre se encontró una buena concordancia con los valores calculados. El pH de todos los medios se ajustó a 5,7 con ClH. La Tabla 13 muestra la composición de los sistemas modelo de "queso fundido". Se agregó SK (Fluka AG, Suiza) en diferentes concentraciones (0,1%, 0,2% y 0,3% p/p). Se

Tabla 13: Composición de los sistemas modelo usados para investigar el desarrollo de C. botulinum tipo A.

Ingrediente		gramos	
		$a_w = 0,974$	$a_w = 0,967$
componentes de los quesos fundidos	sal Ioha S-9	4,16	5,24
	NaCl	1,20	2,04
	lactato de sodio	0,40	1,06
	caseína	10,00	10,00
medio base para produc- ción de toxina	tripticase	2,5	2,5
	extracto de levadura	0,5	0,5
	glucosa	0,5	0,5
	L-cisteína	0,05	0,05
	H <sub>2</sub> O	100,00	100,00
	pH	5,7	5,7

trató que las cantidades de sal fundente, NaCl y lactato estuviesen dentro del rango que pueden encontrarse en estos quesos.

Para preparar el medio se procedió de la siguiente forma: se mezclaron los componentes, se ajustó el pH aproximadamente, luego se disolvió la caseína en baño de agua hirviente. Una vez que se enfrió se ajustó nuevamente el pH con HCl diluido y se reposó el agua evaporada. De esta manera se evitó la formación de coágulos de caseína al acidificar.

#### Determinación de la $a_w$

La actividad de agua de los medios de  $a_w$  reducida se determinó con un higrómetro eléctrico Humicap HM 14 de Vaisala Oy (PL 26 SF-00421 Helsinki 42, Finlandia), cuyo sensor es un capacitor polimérico que varía su capacitancia a medida que cambia la humedad relativa de la muestra. Dado que las lecturas de su dial permiten leer 0,01 unidades de  $a_w$ , las terminales del indicador se conectaron a un milivoltímetro digital modelo 248 (Data Precision, USA) que permitió lecturas a la tercera cifra decimal. La calibración del equipo se hizo con soluciones salinas saturadas de acuerdo al método de Favetto et al. (1983). Los valores de  $a_w$  de dichas soluciones son los recomendados por Chirife et al. (1982) (Tabla 14)



Tabla 14: Actividad de agua de soluciones salinas saturadas a  
25°C (Chirife et al., 1982)

Soluto	$a_w$
NaCl	0,752
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,802
KCl	0,843
$\text{BaCl}_2$	0,902
$\text{KNO}_3$	0,926
$\text{K}_2\text{SO}_4$	0,974

Todas las mediciones se hicieron en una estufa de convección forzada a  $25 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se equilibraron a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas antes de la medición; las determinaciones de  $a_w$  se hicieron por duplicado y se informa el promedio.

#### Inoculación de los sistemas modelo

El medio se colocó en tubos de 15 x 160 mm, con tapa a rosca de baquelita, a razón de 12 ml/tubo. Inmediatamente antes de inocularlos con la suspensión de esporas se regeneró el medio por calentamiento en baño de agua a ebullición. Las esporas recibieron un shock térmico de 10 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$ . Se usaron 10 tubos para cada corrida a una dada combinación de  $a_w$ , sorbato y nivel de inóculo, con excepción de la corrida de  $a_w$  0,974 en la cual se usaron 8 tubos para cada nivel de sorbato. Se trabajó con tres concentraciones de esporas: aproximadamente  $10^4$ ,  $10^3$  y  $10^2$  esporas/ml de medio. Las características de cada sistema modelo pueden verse en la Tabla 15.

#### Incubación

Los sistemas modelo inoculados se incubaron a  $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$  en

///

Tabla 15: Características de los sistemas modelo de queso fundido

	SISTEMA I	SISTEMA II	SISTEMA III
pH	5,7	5,7	5,7
$a_w$	"alta" (0,974)	"baja" (0,967)	"baja" (0,967)
inóculo	medio ( $1,6-2,0 \times 10^3$ )	bajo ( $2,0-3,5 \times 10^2$ )	alto ( $0,8-1,8 \times 10^4$ )
SK (% p/p)	0; 0,1; 0,2; 0,3	0; 0,2; 0,3	0; 0,2; 0,3



una estufa de cultivo.

#### Determinación de la toxina

Las muestras tomadas de cada tubo se centrifugaron y filtraron por filtros Millipore de 0,45  $\mu$ m. Luego se hicieron diluciones sucesivas en buffer gelatina (2 g de gelatina Difco, 4 g de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  Merck en 1000 ml de agua a pH 6,2). La proteína de la gelatina parece minimizar la inactivación de la toxina, reducir las reacciones pirogénicas y potenciar el efecto de la toxina botulínica (Schneider et al., 1963; Naylor and Smith, 1946; Wentzel et al., 1950; Boor et al., 1955). Se inocularon 0,5 ml de cada dilución en pares de ratones blancos Swiss Webster de 18-20 g de peso (0,5 ml/ratón) y los resultados se expresaron como Dosis Letal Mínima/ml de medio (DLM/ml). Los animales se observaron durante cinco días, examinándose los síntomas y la muerte característica por intoxicación botulínica.

#### Recuentos

En dos de los sistemas se hicieron recuentos de los microorganismos presentes (formas vegetativas y/o esporas) usando

Brewer Anaerobic Agar (Difco) con indicador redox en tubos con tapa a rosca (de 15 x 160 mm). Las diluciones se hicieron con solución de triptona sal cisteinada (triptona 0,1%, NaCl 0,85%, clorhidrato de L-cisteína 0,03%). Tanto el medio Brewer como el diluyente se regeneraron en baño de agua a ebullición inmediatamente antes de su uso. Las lecturas se hicieron contando las colonias después de 48 horas de incubación a 32°C, en un microscopio estereoscópico Wild HM 3.

#### Determinación de sorbato en quesos fundidos

Se utilizó el método oxidativo de la AOAC (1980).

## RESULTADOS Y DISCUSION

La actividad de agua de los sistemas modelo de queso fundido se fijaron en 0,967 o 0,974 pues ese rango es el que corresponde con el de los quesos fundidos para untar producidos en Argentina (Magrini et al., 1983). Los resultados de los experimentos de inoculación se graficaron como el número acumulativo de tubos conteniendo toxina/el número de tubos inoculados versus el tiempo de incubación a 32°C y se muestran en las Figuras 4 y 5. La Figura 4 muestra la combinación  $a_w$  "alta"-inóculo medio y  $a_w$  "baja"-inóculo bajo (sistemas modelo 1 y 2) con diferentes niveles de SK, mientras que la Figura 5 se muestra lo mismo para el sistema modelo número 3 ("bajo"  $a_w$ -alto inóculo). Un comportamiento general en todos los sistemas estudiados fue que la adición de sorbato produjo un retraso en la producción de toxina de Clostridium botulinum tipo A. En los sistemas de  $a_w$  0,967 el agregado de SK produjo además una significativa reducción en el título de toxina. En las figuras 4 y 5 podemos ver los valores medios de concentración de toxina de cada corrida; así para el sistema de inóculo bajo, el agregado de 0,2% de sorbato de potasio disminuye las dosis letales mínimas promedio ( $\overline{DLM}/ml$ ) de 16.700 a 1600 y con 0,3% de SK se reduce a tan solo 16 DLM/ml. El efecto es similar



Figura 4: Efecto del sorbato de potasio en la toxicidad de los sistemas de "alta"  $a_w$ -inóculo medio y "baja"  $a_w$ -bajo inóculo inoculados con esporas de C. botulinum tipo A

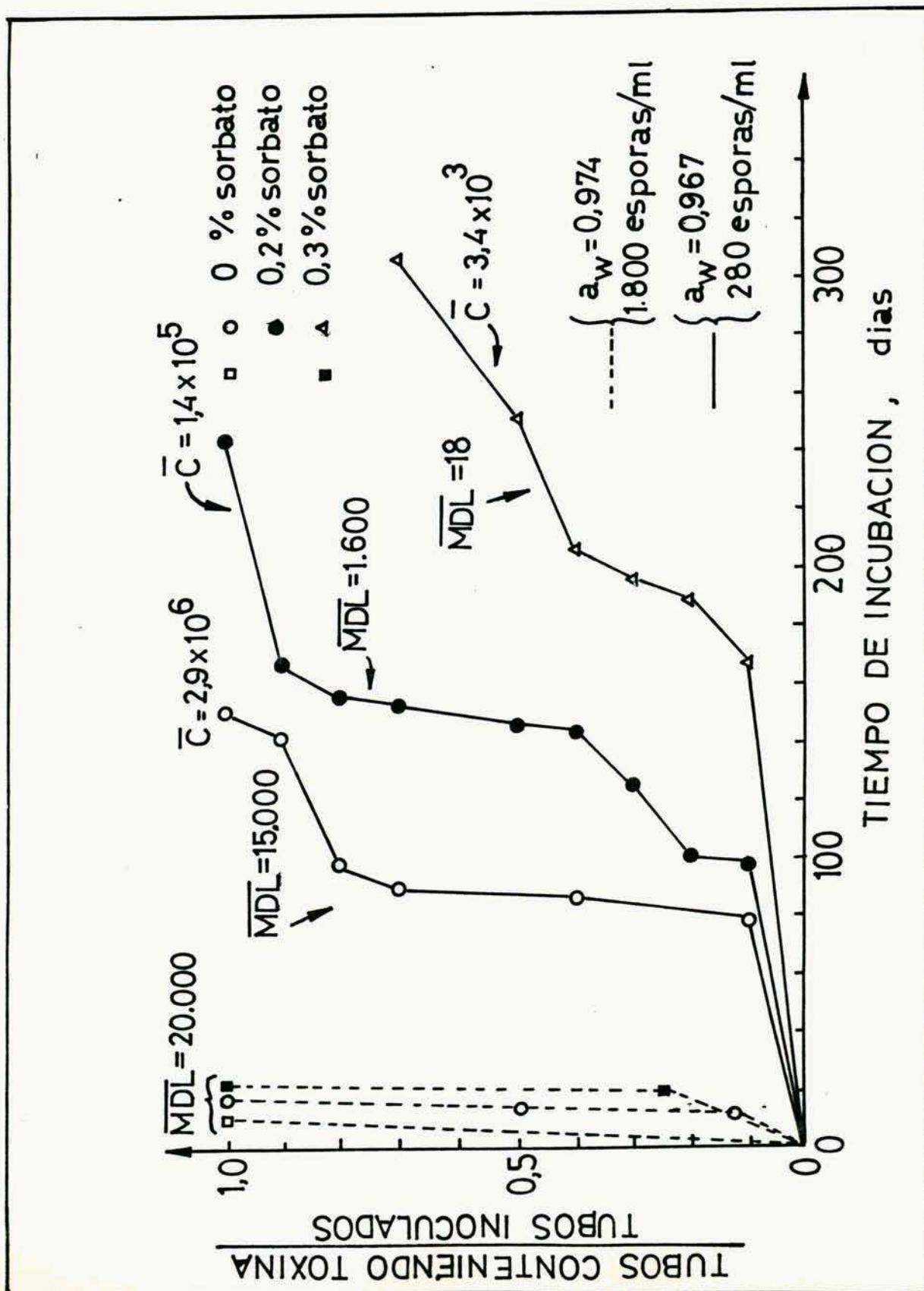
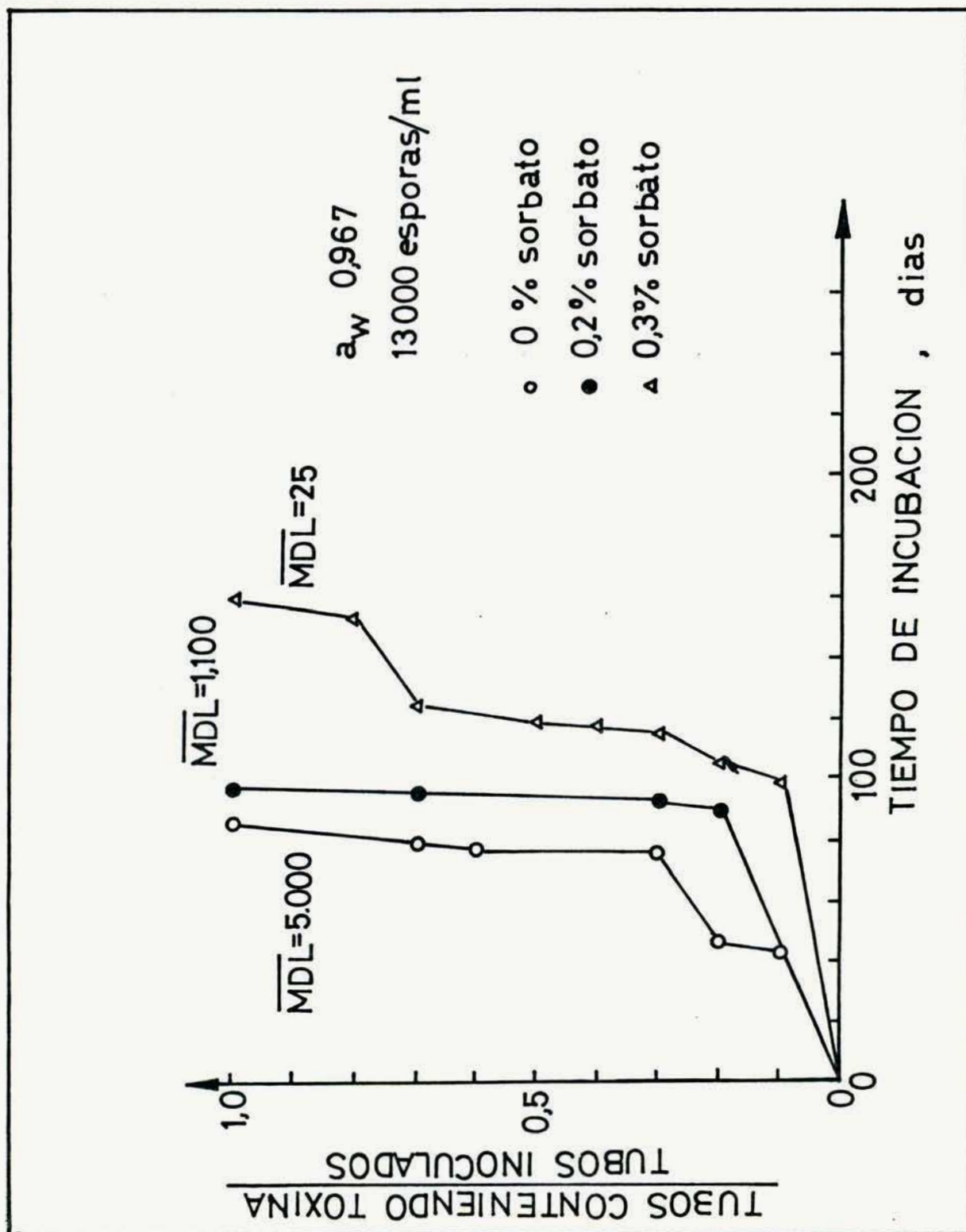


Figura 5: Efecto del sorbato de potasio en la toxicidad del sistema modelo "baja"  $a_w$ -alto inóculo, inoculado con esporas de Clostridium botulinum tipo A.



en el sistema de "baja"  $a_w$ -alto inóculo. En el sistema de "alta"  $a_w$  (0,974) inoculado con 1800 esporas/ml, el retraso en la producción de toxina (entre 0 y 10 días) no parece ser de utilidad práctica y además la DLM no se vio afectada por la adición de sorbato. Sin embargo en los sistemas de "bajo"  $a_w$  (0,967) el retraso en la producción de toxina se hace mucho más importante especialmente en el sistema de bajo inóculo (280 esporas/ml). En este caso el tiempo para que el 50% de los tubos inoculados presenten desarrollo se triplicó para el sistema 3 conteniendo 0,3% de sorbato comparado con el control (0,0% de SK). Parece existir un efecto combinado entre el nivel de  $a_w$  (incluso en un pequeño rango como es el caso de este estudio), el nivel de inóculo y la concentración de sorbato en el retraso de la producción de toxina por el C. botulinum.

Se hicieron recuentos en los sistemas 2 y 3 simultáneamente con las determinaciones de toxina, y dado que éstas se realizaron entre 10 y 20 días después de observado el desarrollo los valores de los recuentos no representan la máxima concentración alcanzada de microorganismos, sino los viables en el momento de hacer el análisis. Los recuentos realizados (bacterias y/o esporas) en los modelos de "baja"  $a_w$  (Tablas 17 y 18) muestran que al incrementar la concentración de sorbato, disminuye el recuento. En la Figura 4



Tabla 16: Efecto del SK en la producción de toxina por el  
Clostridium botulinum tipo A. Sistema 1, "alta" a<sub>w</sub> =  
inóculo medio (1,6-2,0x10<sup>3</sup> esporas/ml)

SK (% p/p)	Tiempo (días) (a)	Producción de toxina	
		tubos con desarrollo (b)	DLM/ml
control	12	7/7	20.000
0,1	12	1/8	20.000
	14	4/8	20.000
	19	8/8	20.000
0,2	19	8/8	20.000
0,3	19	2/8	20.000
	22	8/8	20.000

(a) : tiempo desde la inoculación hasta que se observó desarrollo.

(b) : número acumulativo de tubos conteniendo toxina/tubos inoculados

///

Tabal 17: Efecto del SK en el crecimiento y producción de toxina  
Clostridium botulinum tipo A. Sistema 2, "baja  $a_w$   
(0,967)- bajo inóculo ( $2,0-3,5 \times 10^2$  esporas/ml)

SK (% p/p)	Tiempo (días) (a)	Recuentos (UFC/ml)	Producción de toxina	
			Tubos con desarrollo (b)	DLM/ml
control	79	$3,7 \times 10^4$	1/10	200
	86	$8,0 \times 10^3$	4/10	20.000
	90	$4,5 \times 10^6$	7/10	20.000
	98	$5,6 \times 10^6$	8/10	20.000
	142	$1,0 \times 10^6$	9/10	20.000
	151	$6,0 \times 10^6$	10/10	20.000
0,2	98	----	1/10	200
	101	$9,0 \times 10^4$	2/10	2.000
	125	$6,3 \times 10^4$	3/10	2.000
	144	----	4/10	2.000
	146	$1,7 \times 10^4$	5/10	200
	153	$6,0 \times 10^5$	6/10	2.000

///

Tabla 17 (continuación)

	155	$2,2 \times 10^4$	7/10	2.000
	167	$2,5 \times 10^4$	8/10	2.000
	240	$1,2 \times 10^5$	10/10	2.000
<hr/>				
0,3	167	$1,5 \times 10^3$	1/10	10
	188	$7,0 \times 10^3$	2/10	20
	196	$1,8 \times 10^3$	3/10	20
	206	----	4/10	20
	251	$3,5 \times 10^3$	5/10	20
	305	----	7/10	20
			3/10 (c)	--

(a) : tiempo desde la inoculación hasta que se observó desarrollo.

(b) : número acumulativo de tubos conteniendo toxina/tubos inoculados.

(c) : sin desarrollo en 305 días.



Tabla 18: Efecto del SK en el crecimiento y producción de toxina por el Clostridium botulinum tipo A. Sistema 3, "baja" a<sub>w</sub> (0,967)- alto inóculo (0,8-1,8x10<sup>4</sup> esporas/ml)

SK (% p/p)	Tiempo (días) (a)	Recuentos (UFC/ml)	Producción de toxina	
			Tubos con desarrollo (b)	DLM/ml
control	43	1,7x10 <sup>6</sup>	1/10	2.000
	47	2,0x10 <sup>5</sup>	2/10	2.000
	76	----	3/10	2.000
	77	1,2x10 <sup>5</sup>	6/10	2.000
	79	3,7x10 <sup>4</sup>	7/10	2.000
	86	1,0x10 <sup>6</sup>	10/10	20.000
0,2	90	5,0x10 <sup>4</sup>	2/10	2.000
	93	1,2x10 <sup>5</sup>	3/10	200
	97	5,6x10 <sup>4</sup>	7/10	2.000
	98	2,7x10 <sup>4</sup>	10/10	200
0,3	99	5,5x10 <sup>4</sup>	1/10	10
	105	1,4x10 <sup>4</sup>	2/10	10

///

Tabla 18 (continuación)

115	$9,7 \times 10^4$	3/10	10
118	$1,3 \times 10^4$	4/10	10
119	$1,6 \times 10^4$	5/10	10
125	$3,4 \times 10^5$	7/10	110
153	$2,9 \times 10^4$	8/10	20
160	$2,5 \times 10^4$	10/10	20

---

(a) : tiempo desde la inoculación hasta que se observó desarrollo.

(b) : número acumulativo de tubos conteniendo toxina/tubos inoculados.

se presentan los valores promedio de todos los tubos de cada corrida. El valor medio observado para las muestras del control (0% de sorbato) fue del orden de  $10^6$  UFC/ml, pero se redujo a alrededor de  $10^3$  UFC/ml al agregar 0,3% de sorbato.

Montville (1984) al determinar la eficiencia de las esporas de C. botulinum 62A para formar colonias al sembrarlas en placas con pH entre 7,0 y 5,5 y concentraciones de NaCl de 1,2 y 3% encontró que sólo una cantidad muy pequeña del total de esporas podía generar colonias. Además esta cantidad se reducía en varios órdenes de magnitud al reducir el pH e incrementar la concentración de sal. En un medio con 2% de NaCl y pH 5,5 sólo una cada 1000 esporas podía formar colonias, y a pH 5,7 sólo una cada 100. Si ésto es así, nuestras condiciones de trabajo son muy similares, y eso explicaría por qué nunca se obtuvieron recuentos inferiores al del inóculo, ya que sólo habría desarrollado un 1% de las esporas inoculadas mientras que el resto permanecen viables.

Debe hacerse notar que el primer signo de desarrollo de C. botulinum en estos medios fue la producción de gas seguida de la coagulación de la caseína, la cual no se observó en las muestras de  $a_w$  0,967 conteniendo 0,3% de sorbato y bajo inóculo (280 esporas/ml).

El Código Alimentario Argentino no autoriza expresamente



el uso de SK en quesos fundidos, por lo que se puede suponer que no se lo utiliza en la elaboración de estos quesos. El análisis químico de tres marcas diferentes arrojó resultados negativos confirmando esta presunción, sin embargo los resultados de este estudio sugieren que el uso de sorbato de potasio en una concentración 0,3% (p/p) junto con una leve reducción de la actividad de agua y el pH puede otorgar un margen de seguridad adicional contra el desarrollo y producción de toxina por Clostridium botulinum en quesos fundidos para untar sometidos a un abuso de temperatura. Esto es particularmente cierto con respecto a la marcada disminución del título de toxina producida. De todos modos la efectividad de este procedimiento debe ser verificada por estudios de inoculación del clostridio en el alimento.

## CONCLUSIONES DE LA PARTE I

De los resultados de nuestros ensayos podemos concluir:

1. En todos los sistemas estudiados, la adición de SK entre 0,1-0,3% produce un retraso en el crecimiento y producción de toxina, con una marcada reducción en el número de DLM/ml.
2. Cuando la actividad de agua se reduce a 0,967, la adición de sorbato de potasio en el rango 0,2-0,3% produce un retraso considerable del desarrollo comparado con el control (0% SK).
3. A  $a_w$  0,967 y una baja concentración de esporas (del orden de  $10^2$  esporas/ml) el retraso es especialmente significativo con 0,3% de sorbato.
4. Por último debe notarse que el retraso en la producción de toxina, puede considerarse una "inhibición" en el caso de  $a_w$  0,967 y bajo inóculo con 0,3% de SK, si tenemos en cuenta el tiempo normal de permanencia de estos productos en el mercado.

Los resultados muestran que el agregado de 0,2-0,3% de SK

///

en quesos fundidos para untar, con las características de  $a_w$  y pH como los aquí experimentados, agrega un factor de seguridad que hará más difícil la producción de toxina por C. botulinum tipo A, cuando se incurre en un abuso de temperatura en la conservación.



PARTE II

EFFECTO DE LA ACTIVIDAD DE AGUA Y EL pH EN EL CRECIMIENTO  
Y PRODUCCION DE TOXINA POR Clostridium botulinum TIPO G

## MATERIALES Y METODOS

### El microorganismo

Se usó la cepa n° 89 Clostridium botulinum tipo G, cedida por el Dr. Giménez (Laboratorio de Alimentos, Universidad Nacional de San Luis, Argentina). Después de cultivarlo en medio Taro- zzi a 32°C durante 15 días, se separaron las esporas centrifugando y lavando con solución fisiológica seis veces. Por último se suspendieron en solución fisiológica y se guardaron refrigeradas a 4-6°C en frascos de 50 ml, cerrados herméticamente con atmósfera normal en la oscuridad, conservadas en esta forma.

### Medios de cultivo

Los estudios de crecimiento y producción de toxina se hicieron en medio TP-PGYC: Trypticase (BBL) 2%, Proteosa-peptona (Oxoid) 1%, extracto de levadura (Difco) 0,5%, glucosa 0,5% clorhidrato de L-cisteína (Mallinckrodt) 0,05%, regenerados por calentamiento en baño de agua a ebullición, durante 10 minutos, y enfriados rápidamente hasta 20°C.

### Reducción de la actividad de agua

La actividad de agua del TP-PGYC se redujo experimentalmente con NaCl o con sacarosa ambos de pureza analítica, y se llevó a pH con HCl 1:5 o con NaOH 20%. La  $a_w$  del TP-PGYC se determinó con un crioscopio para leche 4DII de Advanced Instruments (Needham Heights, Mass., USA), calibrado con soluciones standard de NaCl. Todas las mediciones se hicieron por duplicado. El cálculo de la cantidad de NaCl o sacarosa a agregar, para lograr el valor deseado de ( $a_w$ ) se hizo de acuerdo a la ecuación de Ross (1975) (ec. 15). La actividad de agua de las soluciones binarias de NaCl o de sacarosa se obtuvieron de los datos publicados por Chirife y Resnik (1984) y Chirife y col. (1980), tal como se discute más adelante. La composición de los medios de cultivo de diferente  $a_w$  se muestra en la Tabla 19.

### Predicción de la $a_w$ de soluciones de NaCl

Las propiedades termodinámicas de las soluciones de NaCl han sido exhaustivamente estudiadas en los últimos 50 años. Los valores de  $a_w$  fueron determinados e informados como coeficientes osmóticos ( $\phi$ ) para todo el rango de concentraciones y temperatu-



Tabla 19: Gramos de NaCl o sacarosa a agregar al TP-PGYC, cada 100 g de agua, para obtener los valores de  $a_w$  indicados

$a_w$	g NaCl/100 g H <sub>2</sub> O	g sacarosa/100 g H <sub>2</sub> O
0,950	8,10	73,91
0,960	6,27	58,73
0,965	5,25	51,51
0,970	4,52	44,93
0,980	2,77	28,20
0,990	1,01	11,11
0,996	----	-----

ras. La precisión de los métodos usados (por ejemplo el isopiés-tico, medición de presión de vapor) es de 0,0001-0,0002  $a_w$  (Scatchard et al., 1938; Olynik and Gordon, 1943; Platford, 1979). La recopilación de los valores de  $\phi$  muestra que éstos no varían en más de 0,001  $\phi$  (Platford, 1979; Gibbard et al., 1974). El sistema de ecuaciones desarrollado por Pitzer (1973), (ec. 6, 7 y 8), para las propiedades termodinámicas de los electrolitos ajustan los valores experimentales de  $\phi$  dentro del error experimental, tanto para soluciones diluídas como 6 molal.

Chirife y Resnik (1984) tomaron las tablas de Robinson y Stokes (1965); la recopilación de Hammer y Wu (1972) y las mediciones y recopilaciones de Gibbard y col. (1974) para soluciones de NaCl a 25°C y otras temperaturas, y transformaron los coeficientes osmóticos en valores de  $a_w$  usando la ecuación 4. Luego compararon dichas  $a_w$  con los valores predichos usando el modelo de Pitzer (1973) y encontraron una gran concordancia entre ellos para todo el rango de molalidades (hasta 6 m). La mayor diferencia de los valores recopilados con los predichos por el modelo de Pitzer (1973) (a las  $a_w$  más bajas) son inferiores a 0,0007  $a_w$ .

Además Chirife y Resnik (1984) comparando los valores de los coeficientes osmóticos (transformados en  $a_w$ ) de las soluciones de NaCl, para distintas temperaturas en el rango 15-50°C ha-

llaron que la  $a_w$  de estas soluciones varía muy poco con la temperatura y que no difieren en más de 0,002 con los valores a 25°C. Teniendo en cuenta que existe una concordancia "universal" entre los valores de  $a_w$  experimentales y los predichos para soluciones de NaCl, y que además éstos son casi invariantes con la temperatura, se utilizó directamente la ecuación de Pitzer (1973) (ec. 6) para predecir la cantidad de NaCl a agregar a cada medio de cultivo. La corrección por la  $a_w$  del medio de cultivo puro se hizo según la ec. (15).

#### Predicción de la $a_w$ de las soluciones de sacarosa

Los valores de  $a_w$  versus concentración para las soluciones binarias de sacarosa se obtuvieron mediante la ecuación de Norrish (1966) (ec. 12) y los valores de  $K$  de Chirife et al. (1980). Estos últimos usaron un programa de computadora para calcular los mejores valores de  $K$  (ec. 12) cuando se aplicaba la ecuación de Norrish a los valores de  $a_w$  de soluciones de sacarosa recopilados por Teng y Lenzi (1974). De dicho análisis surge,  $K = 6,47^{+0,06}$  para la sacarosa. Con dicha constante se generaron los valores de  $a_w$  vs. concentración para la sacarosa en el rango de interés para nuestro estudio. Dichos valores pueden verse en la



Tabla 20. Al igual que con el NaCl, para calcular la  $a_w$  final del caldo de cultivo se tuvo en cuenta la  $a_w$  propia del caldo puro y la ecuación 15.

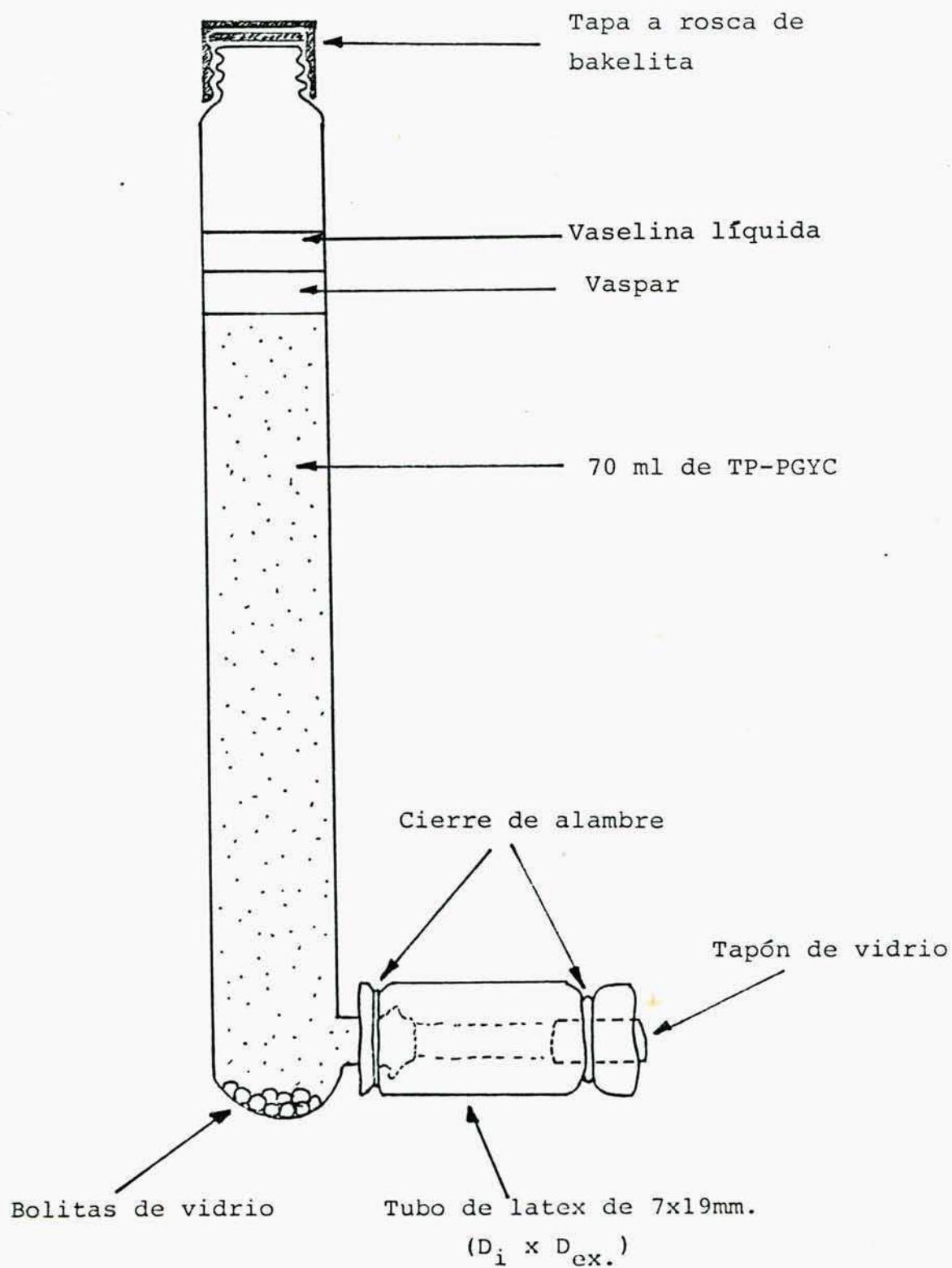
#### Cultivo del microorganismo

Para construir una curva de desarrollo, es necesario tomar las muestras de un mismo sistema, sin modificar las condiciones de anaerobiosis. Con este fin se diseñó el dispositivo de la Figura 6, el cual es un tubo de vidrio Pyrex de 24x250 mm, con una salida lateral unida a un tubo de latex de pared gruesa cuyo extremo se cerró mediante un tapón de vidrio. Este dispositivo se llenó con 70 ml de TP-PGYC bajo atmósfera de  $N_2$ , para evitar la oxidación de sus componentes (Holdeman and Moore, 1973). Antes de usarlo se regeneró su anaerobiosis por calentamiento en agua a ebullición y se cubrió con una capa de vaspar estéril. Cuando esta capa se hubo solidificado se agregó una capa de vaselina líquida también estéril. De esta forma se obtuvo un sistema que permitió hacer la inoculación o tomar muestras a través del tubo de látex por medio de una jeringa de 3 cc. 25 G x 5/8 (Becton-Dickinson), sin producir ningún cambio en las condiciones del cultivo. Las bolitas de vidrio se agregaron para lograr una bue-

Tabla 20: Valores de  $a_w$  vs. concentración, para soluciones de sacarosa, generados mediante la ecuación de Norrish (1966), con  $K = 6,47^{+0,06}$

conc. (%P/P)	$a_w$	conc. (%P/P)	$a_w$
1,000	0,999	23,000	0,983
2,000	0,999	24,000	0,982
3,000	0,998	25,000	0,981
4,000	0,998	26,000	0,980
5,000	0,997	27,000	0,979
6,000	0,997	28,000	0,977
7,000	0,996	29,000	0,976
8,000	0,995	30,000	0,975
9,000	0,995	31,000	0,974
10,000	0,994	32,000	0,972
11,000	0,993	33,000	0,971
12,000	0,993	34,000	0,969
13,000	0,992	35,000	0,968
14,000	0,991	36,000	0,966
15,000	0,990	37,000	0,964
16,000	0,989	38,000	0,963
17,000	0,989	39,000	0,961
18,000	0,988	40,000	0,959
19,000	0,987	41,000	0,957
20,000	0,986	42,000	0,955
21,000	0,985	43,000	0,953
22,000	0,984	44,000	0,951

Figura 6: Dispositivo experimental





na homogeinización del medio. Tanto al introducir el inóculo (1,2 ml), como al extraer muestras para su análisis, se debe aflojar la tapa de baquelita, permitiendo el libre movimiento del cierre de vaselina líquida-vaspar. Además de este dispositivo, se utilizaron 20 tubos de ensayo (15x160 mm) con tapa a rosca (conteniendo 12 ml de cada medio), los cuales permitieron tener un valor promedio de los tiempos de desarrollo. Todos los inóculos estuvieron entre 1000 y 5000 esporas por ml de medio.

Para evitar la modificación del  $a_w$  de los diferentes medios, al agregar el inóculo de esporas se procedió de la manera siguiente: se diluyó 1 ml de la solución madre de esporas en 9 ml de TP-PGYC de  $a_w$  0,996 e igual pH, se le dio el shock térmico y luego se diluyó 1 ml en 9 de TP-PGYC del mismo  $a_w$  y pH que el de cada medio a inocular.

### Incubación

Los caldos de diferente  $a_w$  y pH previamente inoculados en la forma descripta, se incubaron a 32°C en una estufa de temperatura constante.

### Recuentos

Se utilizó como diluyente para los recuentos BHI (Brain Heart Infussion, Difco) diluido al cuarto, adicionado de 0,06% de agar (Difco) y 0,05% de L-cisteína. Se distribuyó en tubos con tapa a rosca, a razón de 9 ml por tubo y se los regeneró inmediatamente antes de su uso. Los recuentos se hicieron en Brewer Anerobic Agar (Difco) que se incubó durante 48 hroas a 32°C (tiempos mayores no mostraron incrementos en el número de colonias contadas). Para evitar al máximo el contacto de los microorganismos con el O<sub>2</sub>, la muestra (3 ml) se extrajo con la jeringa en posición vertical, de manera que la burbuja que se forma por el aire presente en el cuello de la aguja, quede junto al émbolo. Al vaciar la jeringa, el primer ml se introdujo en el tubo de dilución para recuento y los siguientes (que estuvieron en contacto con la burbuja) se usaron para analizar toxina.

### Determinación de la toxina

Para determinar las condiciones óptimas de activación de la toxina se usaron dos cultivos de Clostridium botulinum tipo G en TP-PGYC de 6 días. El primero, después de centrifugado y

filtrado por filtros Millipore de 0,45  $\mu$ m se dividió en cuatro fracciones que se llevaron a pH 5,5; 6,0; 6,5 y 7,0. A cada una de ellas se les agregó una solución de tripsina Difco (1:250) al 10%, 1% y 0,5% de manera de obtener una concentración final de 1, 0,1 y 0,05% y se incubó 45 minutos a 37°C en un baño termostático de agua. Al segundo cultivo luego de centrifugado y filtrado se lo llevó a pH 6,5 y se lo incubó a 37°C con 0,1% de tripsina (concentración final) durante 15, 30, 45, 60 y 75 minutos. Se determinó el nivel de toxina presente, por inoculación intraperitoneal de ratones de 18-20 g. Se inocularon 0,5 ml/ratón y dos ratones por dilución. Las diluciones de los medios conteniendo la toxina activada se hicieron con buffer gelatina (2 g de gelatina Difco, 4 g  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  Merck, en 1000 ml de agua a pH 6,21).

#### Shock térmico

Para dar el shock térmico a las esporas se diluyeron 2 ml de la suspensión de esporas en 18 ml de TP-PGYC y se calentaron 10 minutos a 75°C. Inmediatamente se colocaron en agua con hielo hasta su uso. Para investigar si la composición del medio y el pH tenían algún efecto sobre las esporas al calentarlas a 75°C, se hizo el siguiente ensayo: se inoculó 1 ml de la suspensión de



esporas en 9 ml de TP-PGYC pH 7,0, en TP-PGYC pH 5,6 y en solución fisiológica de pH 7,1. A todos se les dio un shock térmico de 10 minutos a 75°C y se hicieron los recuentos. También se hizo un recuento sin calentar.

#### Determinación de pH

Las determinaciones de pH se hicieron con un peachímetro Orion Ioanalyzer 901. Para verificar si la cantidad de HCl o NaOH agregada para ajustar el pH producía alguna modificación de  $a_w$ , se determinó el punto de congelación de los medios de diferente pH y se los convirtió en valores de  $a_w$ . El descenso del punto de congelación ( $\theta_F$ ) puede ser transformado en  $a_w$  de acuerdo a la siguiente expresión (Ferro Fontán and Chirife, 1981)

$$- \ln a_w = (9,6934 \times 10^{-3}) \theta_F + (4,761 \times 10^{-6}) \theta_F^2 \quad (16)$$

Se debe destacar que la  $a_w$  obtenida de esas determinaciones es la correspondiente al punto de congelación. Sin embargo, para las actividades de agua involucradas en estos experimentos (0,98 y superiores) pueden ser consideradas como independientes de la temperatura (Ferro Fontán and Chirife, 1981; Chirife et al.,

1982).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Predicción de la $a_w$ de las soluciones de NaCl y sacarosa

La Tabla 21 muestra los valores de  $a_w$  del caldo TP-PGYC ajustado a diferentes valores de pH; se observa que la variación de pH no se traduce en cambios significativos en la actividad acuosa. El análisis del error de las determinaciones de  $a_w$  a partir de la medida del punto de congelación hecho por Miracco y col. (1981) mostró que la precisión del método permite expresar la  $a_w$  a la cuarta cifra decimal. En algunos casos, nosotros determinamos experimentalmente la  $a_w$  (usando un higrómetro Vaisala, Humicap HM-14, Finland) y se encontró una excelente correspondencia con los valores predichos mediante las ecuaciones (6) y (15).

### Shock térmico

Según diferentes investigadores el shock térmico activa las esporas y permite una germinación más pareja y rápida de las mismas. En cuanto a la temperatura a usar varía con el microor-

///

Tabla 21:  $a_w$  de soluciones de TP-PGYC de distintos pH

pH	Desc. Crioscópico ( ° Horvet)	$a_w$
7,21	0,421	0,9961
6,41	0,427	0,9960
5,81	0,421	0,9960
5,12	0,442	0,9959
5,08	0,439	0,9959
4,50	0,459	0,9957

///

///



ganismo, así por ejemplo las cepas proteolíticas de los tipos A, B o F requieren temperaturas más altas que son letales para el tipo E o para las cepas no proteolíticas de los tipos B y F. Lynt y col. (1984) informaron que la cepa 89 y la 2739 G de Clostridium botulinum tipo G producen dos tipos de esporas. Una que se destruye fácilmente por el calentamiento de 10 minutos a 80°C en buffer fosfato y otra que sobrevive a temperaturas más elevadas, siendo la forma lábil mucho más abundante (10.000 a 1 para la cepa 89 y 100 a 1 para la 2739 G).

El tiempo de reducción decimal D se define como el tiempo de calentamiento a una dada temperatura para obtener una reducción del 90% en la población microbiana (corresponde a un ciclo logarítmico). Conocido  $D_T$  y su dependencia con la temperatura (es decir z, la pendiente de la curva D vs. T) se puede calcular D a cualquier temperatura usando la expresión

$$\frac{D_{T_2}}{D_{T_1}} = 10^{\frac{T_2 - T_1}{z}}$$

donde T y z se expresan en °F.

Si calculamos D a 75°C (167 °F) con los datos que dan Lynt

///

et al. para las esporas más termoresistentes, resulta que para  $D_{210}^{37,9} = 1,77$  minutos obtenemos  $D_{167}^{37,9} = 20,58$  minutos. Si ahora analizamos en cuánto debería reducirse la población de esporas por un calentamiento de 10 minutos a  $167^{\circ}\text{F}$  ( $75^{\circ}\text{C}$ ) mediante la expresión

$$\frac{c}{c_0} = 10^{\frac{-t}{D}}$$

donde  $c_0$  es la concentración inicial de esporas y  $c$  la concentración que sobrevive luego de calentarlas un tiempo  $t$  a una dada temperatura, resulta que para una población inicial de  $8,5 \times 10^5$  esporas/ml,  $c = 3,3 \times 10^5$  esporas/ml. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no concuerdan con los presentados por Lynt et al. Tal como muestra la Tabla 22 las esporas en las condiciones descriptas no presentan diferencias en los recuentos cuando se las calienta 10 minutos a  $75^{\circ}\text{C}$  a pH 5,6 o 7,0 en TP-PGYC, o pH 7,0 en solución fisiológica. Además, la diferencia con el recuento sin calentamiento muestra que las esporas usadas son todas de una resistencia térmica igual o mayor que las estudiadas por Lynt y col. Probablemente el resultado obtenido por Lynt y col. se deba a que el medio utilizado para producir las esporas no era el óptimo.

Tabla 22: Efecto del tratamiento térmico en el recuento de esporas de Clostridium botulinum tipo G, cepa 89

Tratamiento	Recuento (UFC/ml)
sin calentamiento	$8,5 \times 10^5$
10 minutos a 75°C en TP-PGYC pH 7,04	$5,8 \times 10^5$
10 minutos a 75°C en TP-PGYC pH 5,60	$5,6 \times 10^5$
10 minutos a 75°C en sol. fisiol. pH 7,13	$6,0 \times 10^5$



Condiciones para la activación de la toxina

El Clostridium botulinum tipo G es un microorganismo débilmente proteolítico, que al igual que el E produce una toxina con bajo título que se incrementa notablemente por el tratamiento con tripsina (Duff et al., 1956). Giménez y Ciccarelli (1970 b) usaron 0,01% de concentración final de tripsina, a pH 5,8, e incubaron 2 horas a 37°C. Ciccarelli et al. (1977), hicieron la activación con 0,1% de concentración final e incubaron 30 minutos a 37°C. Solomon y Kautter (1979) lo hicieron de acuerdo al manual de la FDA (Food & Drug Administration 1978, con 1% de concentración final de tripsina, a pH 6,2 e incubando 1 hora a 37°C.

Esta variedad de posibilidades nos llevó a buscar las condiciones óptimas de activación de la toxina. Los resultados pueden verse en las Tablas 23 y 24. En base a ellas, la tripsinización se hizo a lo largo de este trabajo, llevando a pH 6,5, 1,35 ml del medio que la contenía, luego se agregó 0,15 ml de solución al 1% de tripsina (concentración final 0,1%) y se incubó 45 minutos a 37°C en un baño termostático. La toxicidad del medio sin activación se determinó sin ajustar el pH.

Tabla 23: Efecto de la concentración de tripsina y el pH en la activación de la toxina botulínica (expresado en dosis letales mínimas, ratón por ml).

MDL, ratón/ml			
pH	1,0%	0,1%	0,05%
7,0	2.000	20.000	10.000
6,5	10.000	20.000	20.000
6,0	2.000	20.000	10.000
5,5	1.000	2.000	2.000

Tabla 24: Determinación del tiempo de incubación de la toxina con tripsina para su activación a 37°C

tiempo (min)	MDL, ratón/ml
15	2.000
30	2.000
45	4.000
60	3.000
75	2.000



Efecto del pH y la actividad acuosa

Es bien conocido el hecho de que la  $a_w$  es uno de los factores importantes que afectan el desarrollo microbiano (Scott, 1957; Troller and Christian, 1978). Ohye y col. (1966) encontraron que la cepa más tolerante de Clostridium botulinum tipo E estudiada por ellos crecía a un  $a_w$  mínimo de 0,965 a 30 o 25°C y que cualquier reducción de la  $a_w$  por debajo del óptimo (0,995) afectaba la velocidad de crecimiento de las cepas. Ohye y Christian (1966) estudiaron el efecto de la  $a_w$  y el pH en la capacidad de las esporas de Clostridium botulinum tipos A, B y E de desarrollar a temperaturas entre 0 y 50°C. A las temperaturas óptimas de desarrollo (30-40°C) y pH 7,0 la mínima  $a_w$  que limitaba el desarrollo fue: 0,95 para el tipo A, 0,94 para el B y 0,97 para el E. Disminuyendo el pH del medio de cultivo encontraron que se incrementa la mínima  $a_w$  a la cual las esporas desarrollan. Similares resultados obtuvieron Baird-Parker y Freame (1967).

En el presente trabajo no se determinó la  $a_w$  mínima para la germinación de las esporas, sino la mínima  $a_w$  para lograr desarrollo y producción de toxina. Por ejemplo, a  $a_w$  0,96 (NaCl) y pH 6,9 se observaron algunos pocos bacilos, pero éstos no logran desarrollar ni producir toxina.

Los límites de  $a_w$  y pH así como su interacción no han sido descriptos para el Clostridium botulinum tipo G. Los resultados obtenidos en nuestras condiciones de estudio para las distintas actividades de agua y pH, usando NaCl como humectante, pueden verse en las Figuras 7 a 12. Las Figuras 13 a 15 muestran similares resultados pero usando sacarosa para reducir la actividad acuosa. Estas figuras indican, entre otras cosas, la mínima  $a_w$  para cada pH- a la cual se observo desarrollo al cultivar los caldos a 32°C. Hay varios comentarios que pueden hacerse sobre los resultados obtenidos. En primer lugar, cabe destacar el paralelismo entre las curvas de crecimiento (log UFC/ml vs. tiempo de incubación) y las de producción de toxina (log MDL/ml vs. tiempo de incubación). En ambos casos la reducción de la  $a_w$  produce los siguientes efectos: a) extensión del período "lag"; b) reducción de la velocidad específica de crecimiento y producción de toxina; c) disminución del número máximo de células alcanzado y el título de la toxina; d) inhibición completa de desarrollo y/o producción de toxina por debajo de cierto valor de  $a_w$ .

La importancia de activar la toxina con tripsina para una mejor sensibilidad de detección se aprecia comparando los resultados que se muestran en las Figuras 7, 8, 9, 10, 11 y 12 (todas para NaCl), y las Figuras 13, 14 y 15 (para sacarosa). En ellas

Figura 7: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,9 en el crecimiento y producción de toxina por *C. botulinum* tipo G cepa 89, incubado a 32°C.

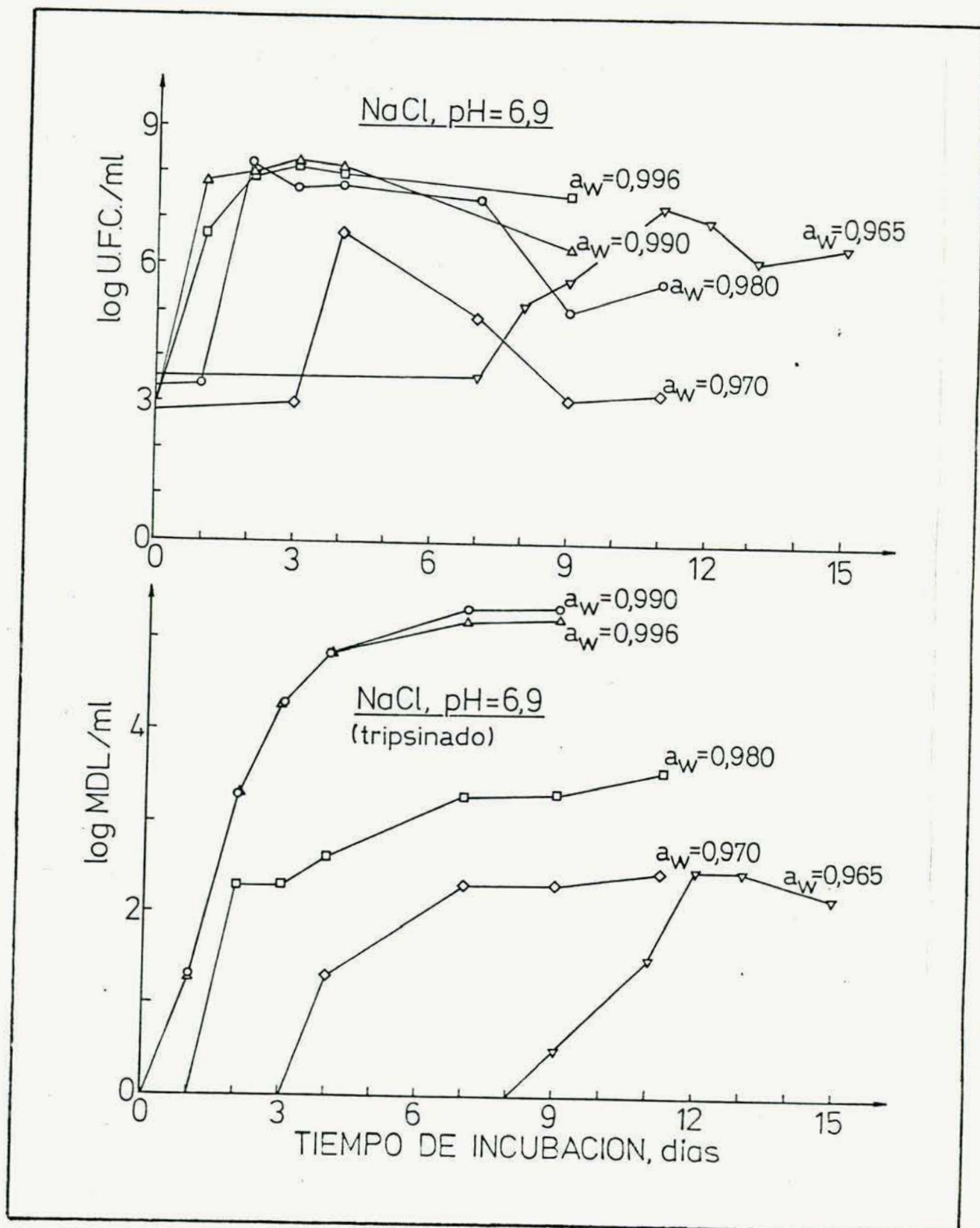




Figura 8: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,9, en la producción de toxina por C. botulinum tipo G, cepa 89 incubado a 32°C (sin tripsinar).

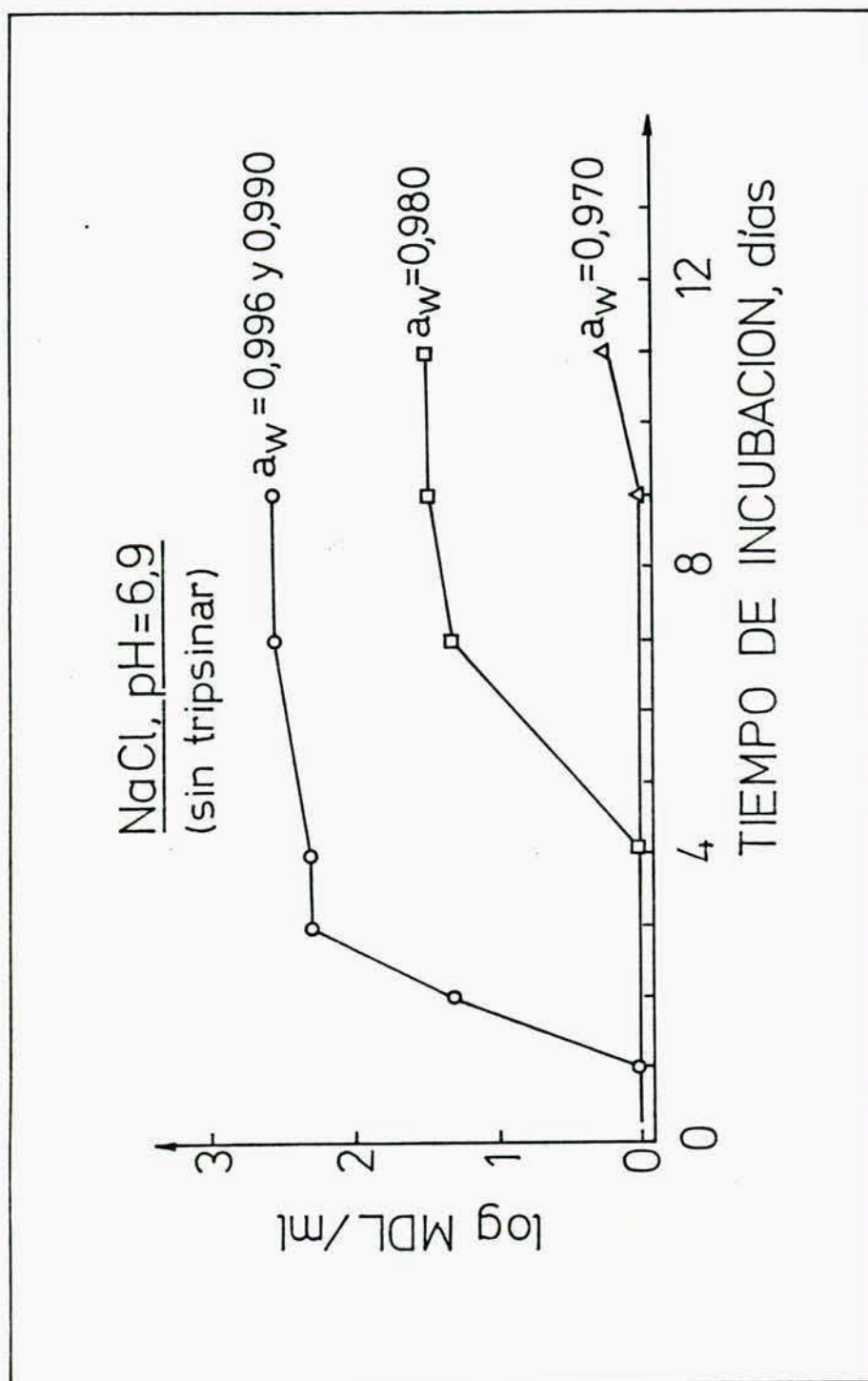


Figura 9: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,9 en la producción de toxina por el C. botulinum tipo G, cepa 89 incubado a 32°C (sin tripsinar).

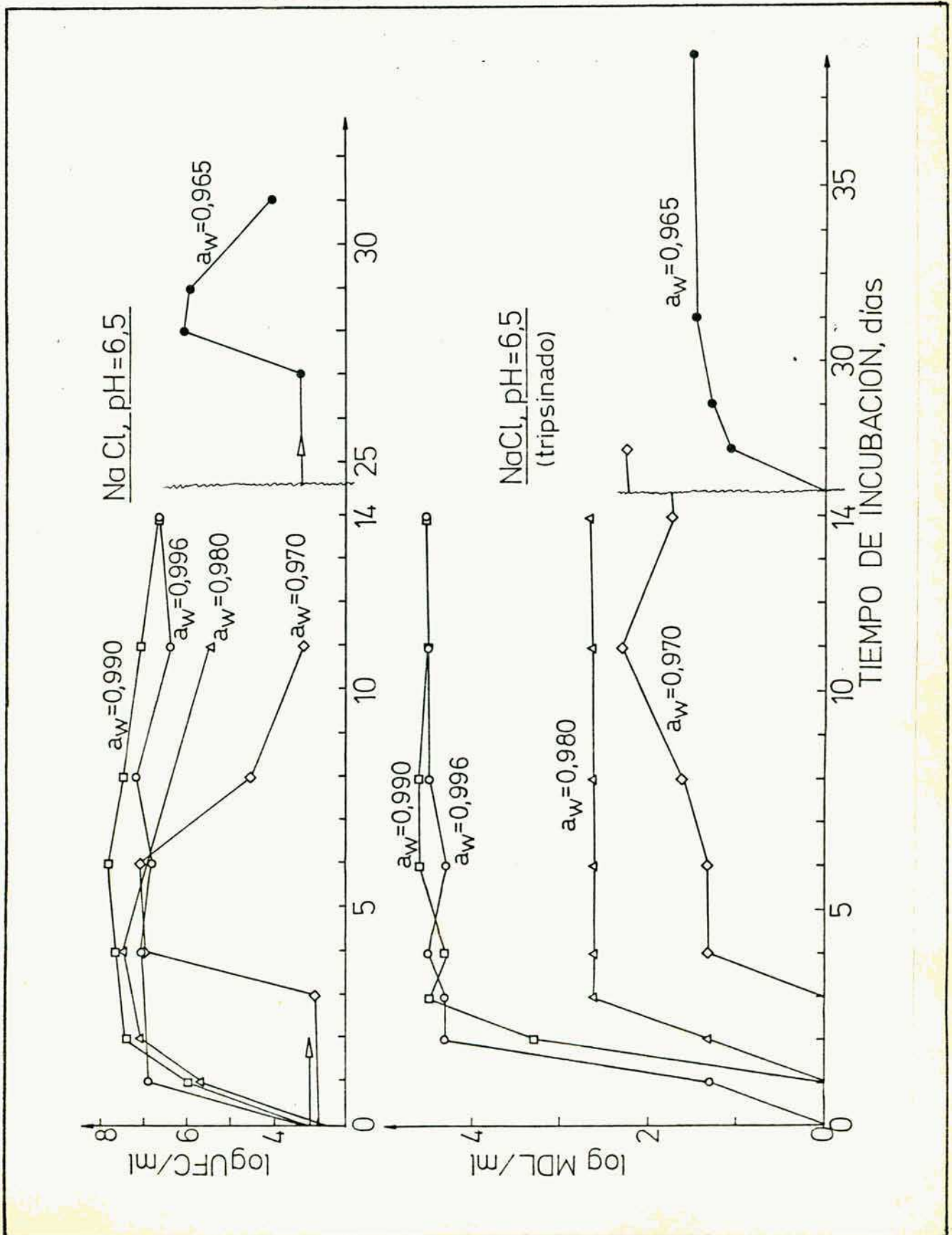


Figura 10: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,5 en la producción de toxina por el C. botulinum tipo G, cepa 89, a 32°C (sin tripsinar).

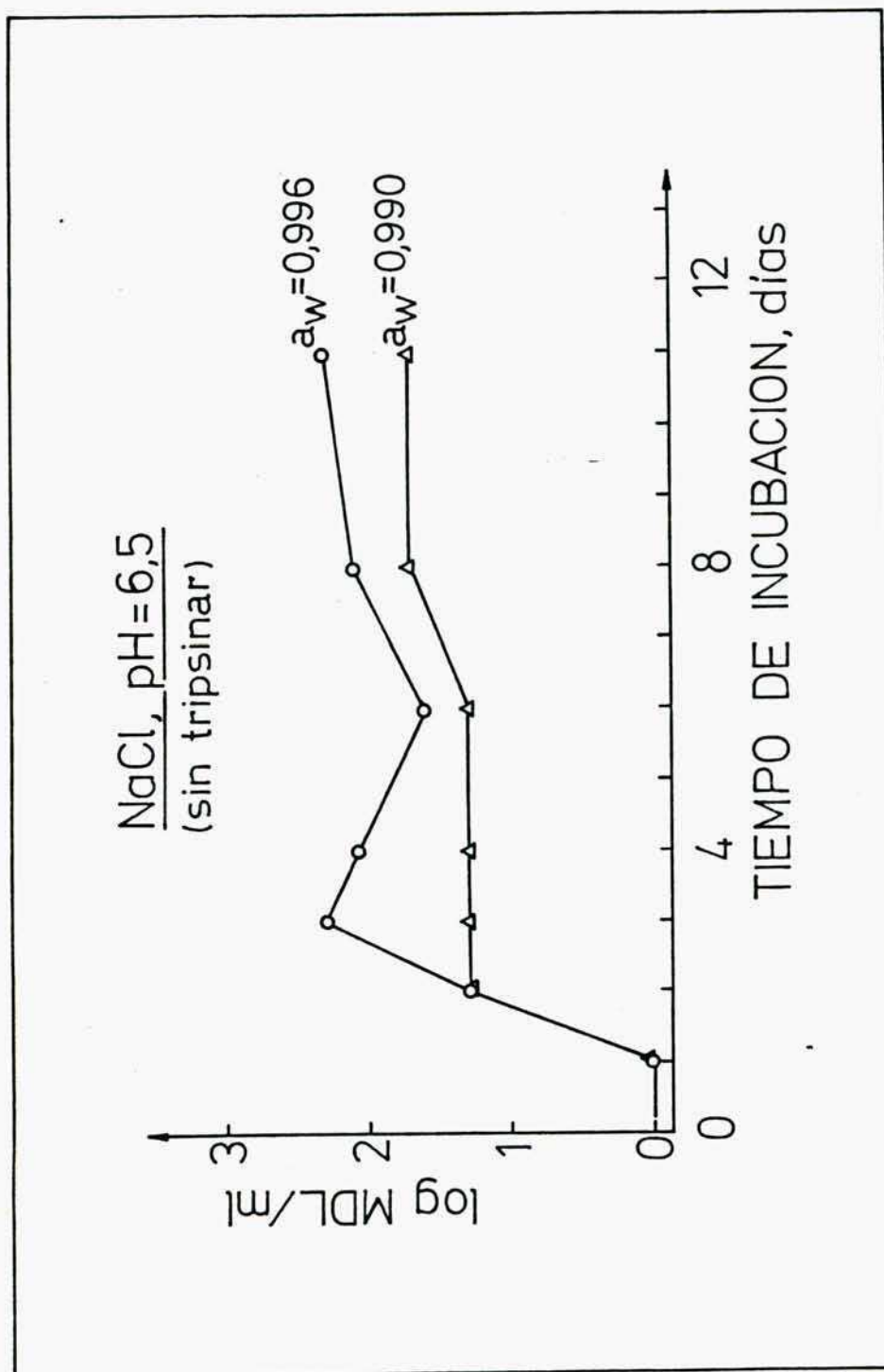




Figura 11: Efecto de la  $a_w$  a pH 5,9 en el crecimiento y la producción de toxina por el *C. botulinum* tipo G, cepa 89, incubado a 32°C.

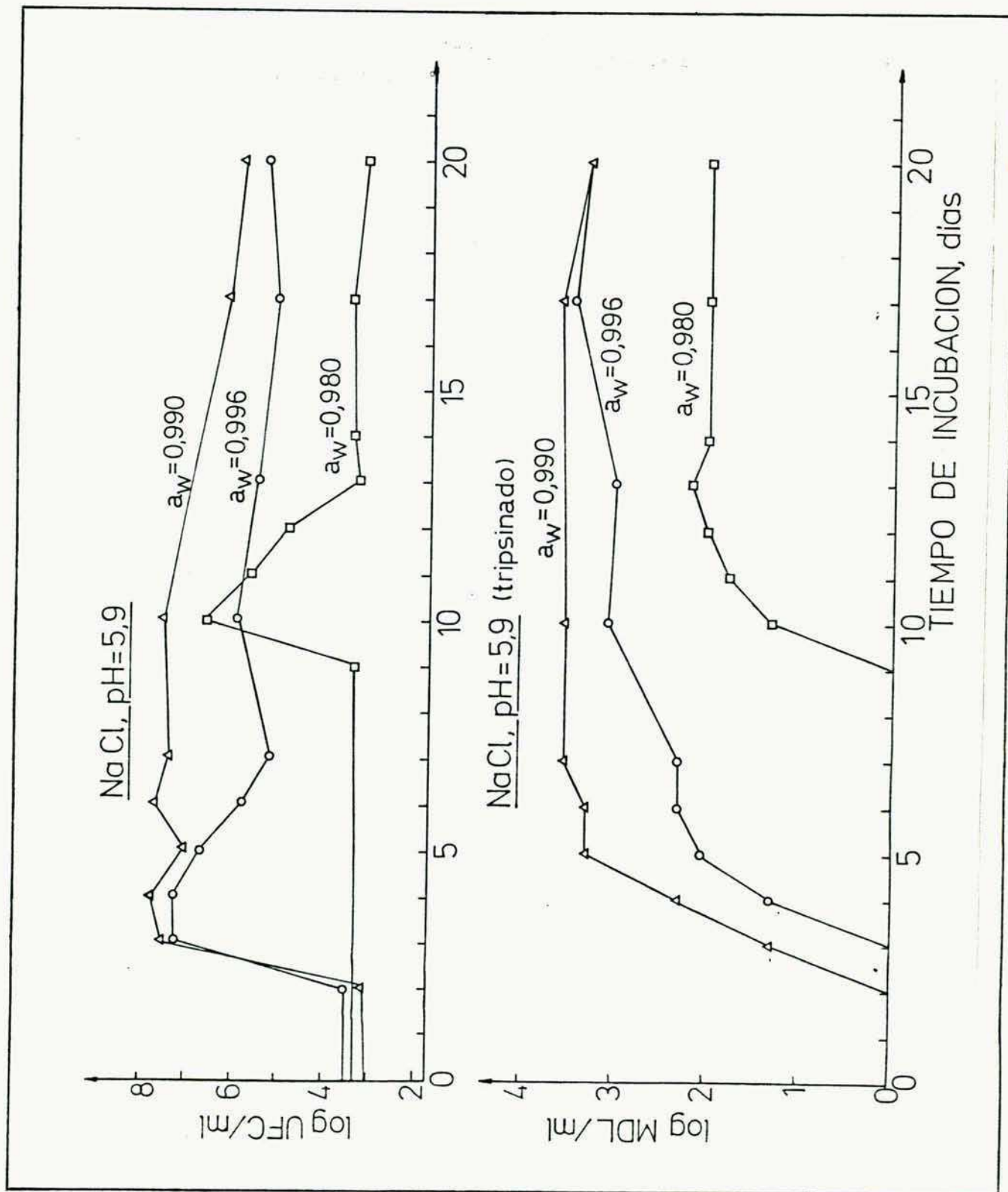


Figura 12: Efecto de la  $a_w$  a pH 5,9 en la producción de toxina por el C. botulinum tipo G, cepa 89 incubado a 32°C (sin tripsinar).

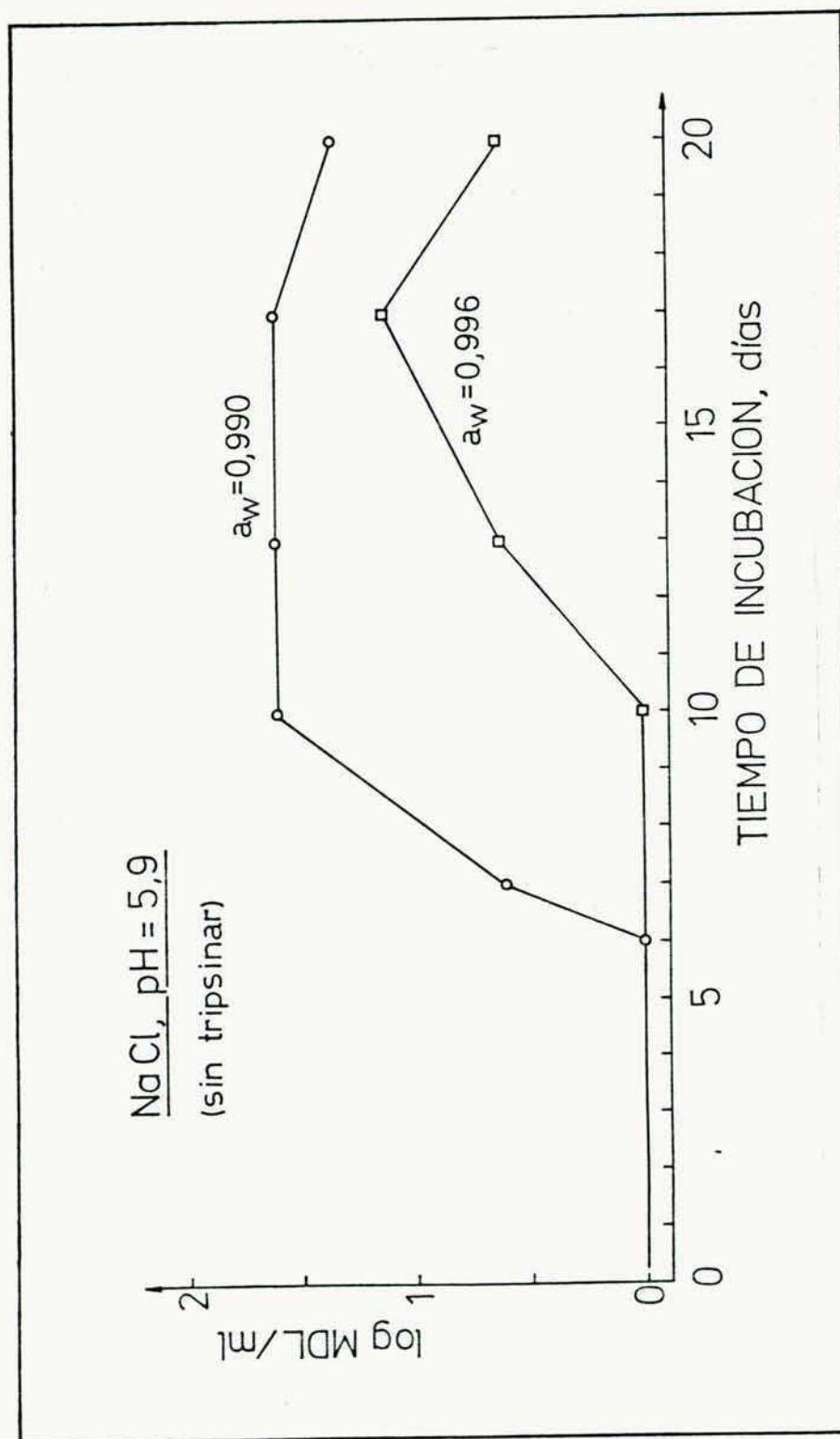


Figura 13: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,9 en el crecimiento y la producción de toxina por el *C. botulinum* tipo G, cepa 89, incubado a 32°C.

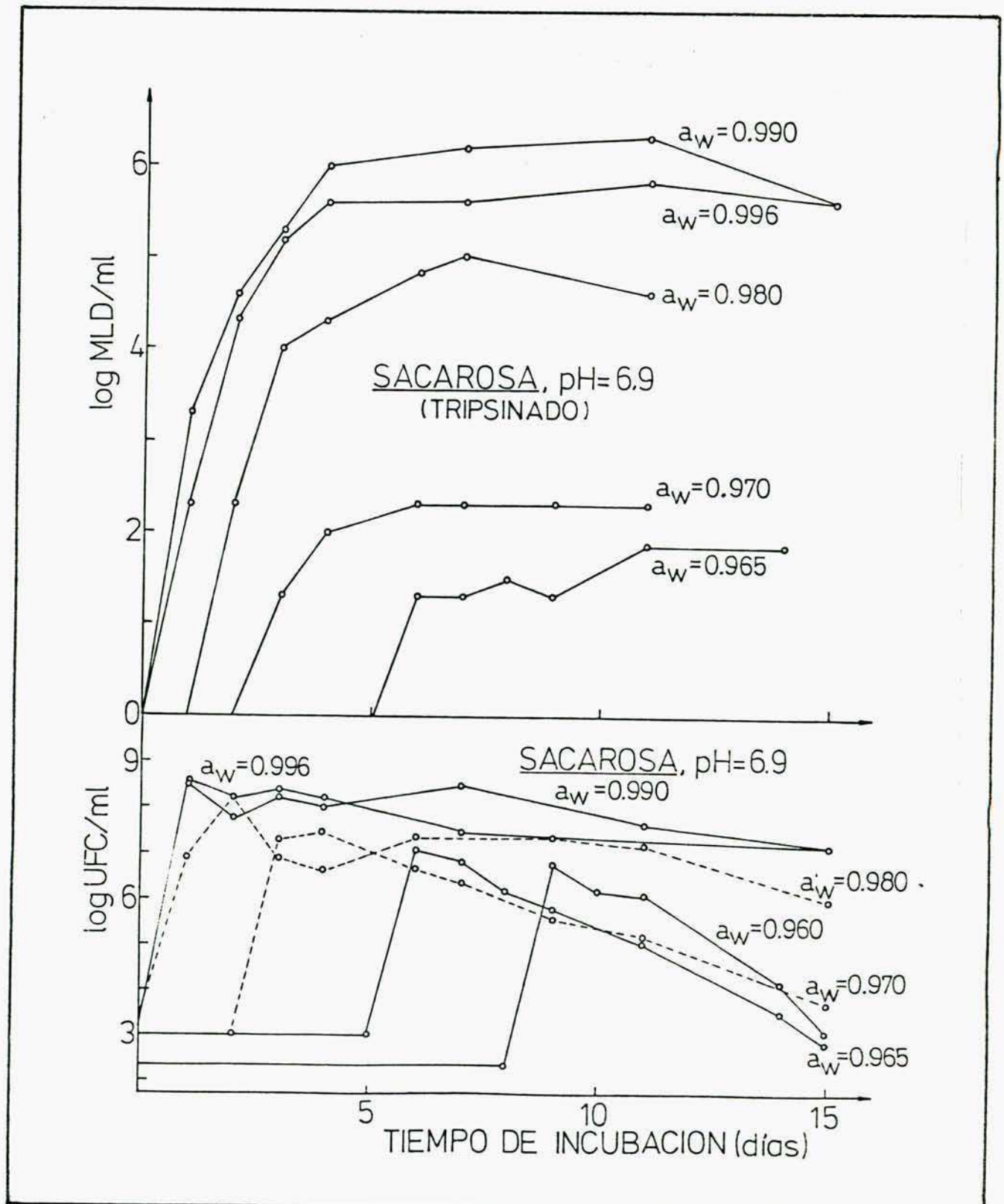




Figura 14: Efecto de la  $a_w$  a pH 6,9 en la producción de toxina por la cepa 89 de C. botulinum tipo G incubado a 32°C (sin tripsinar)

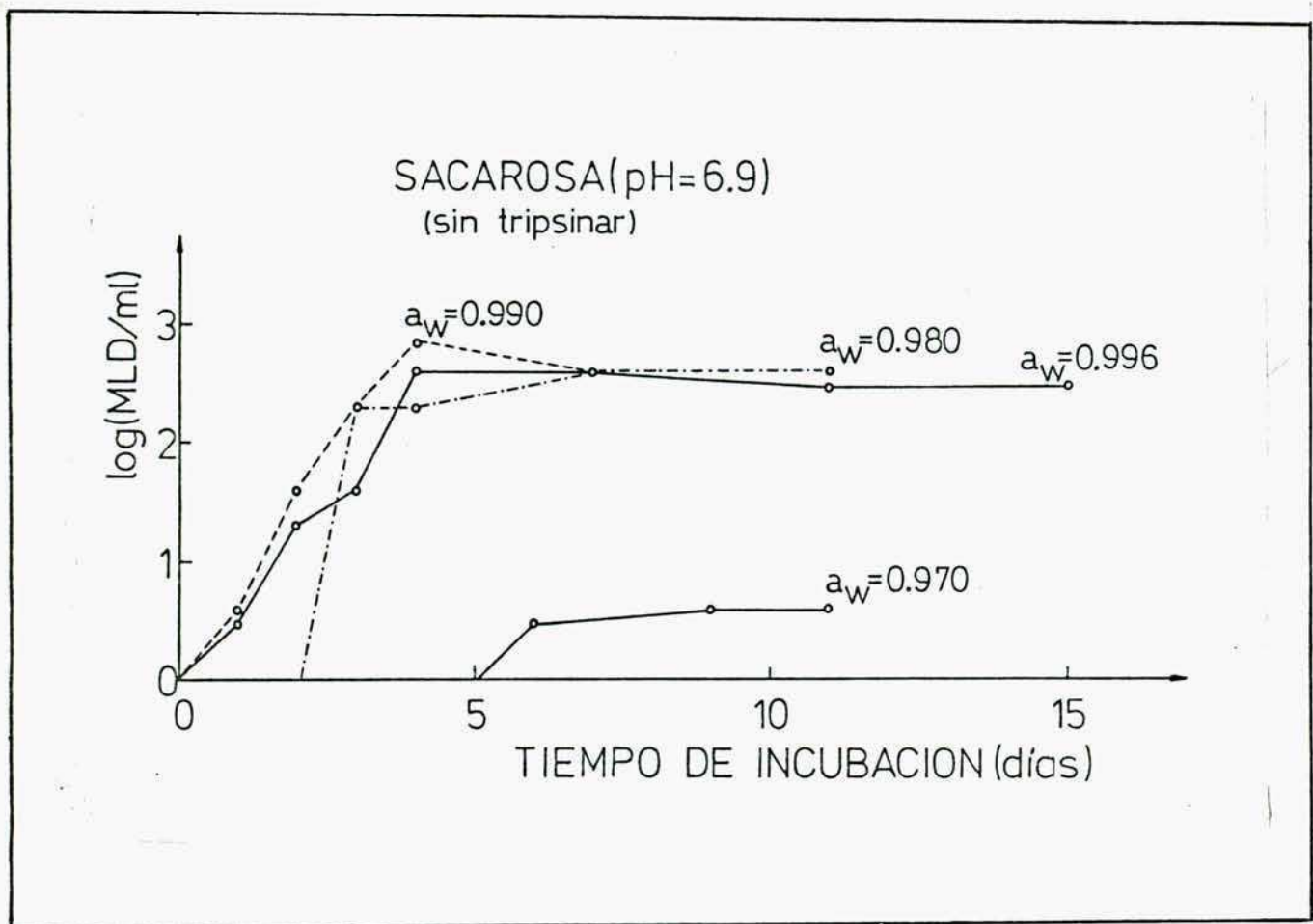
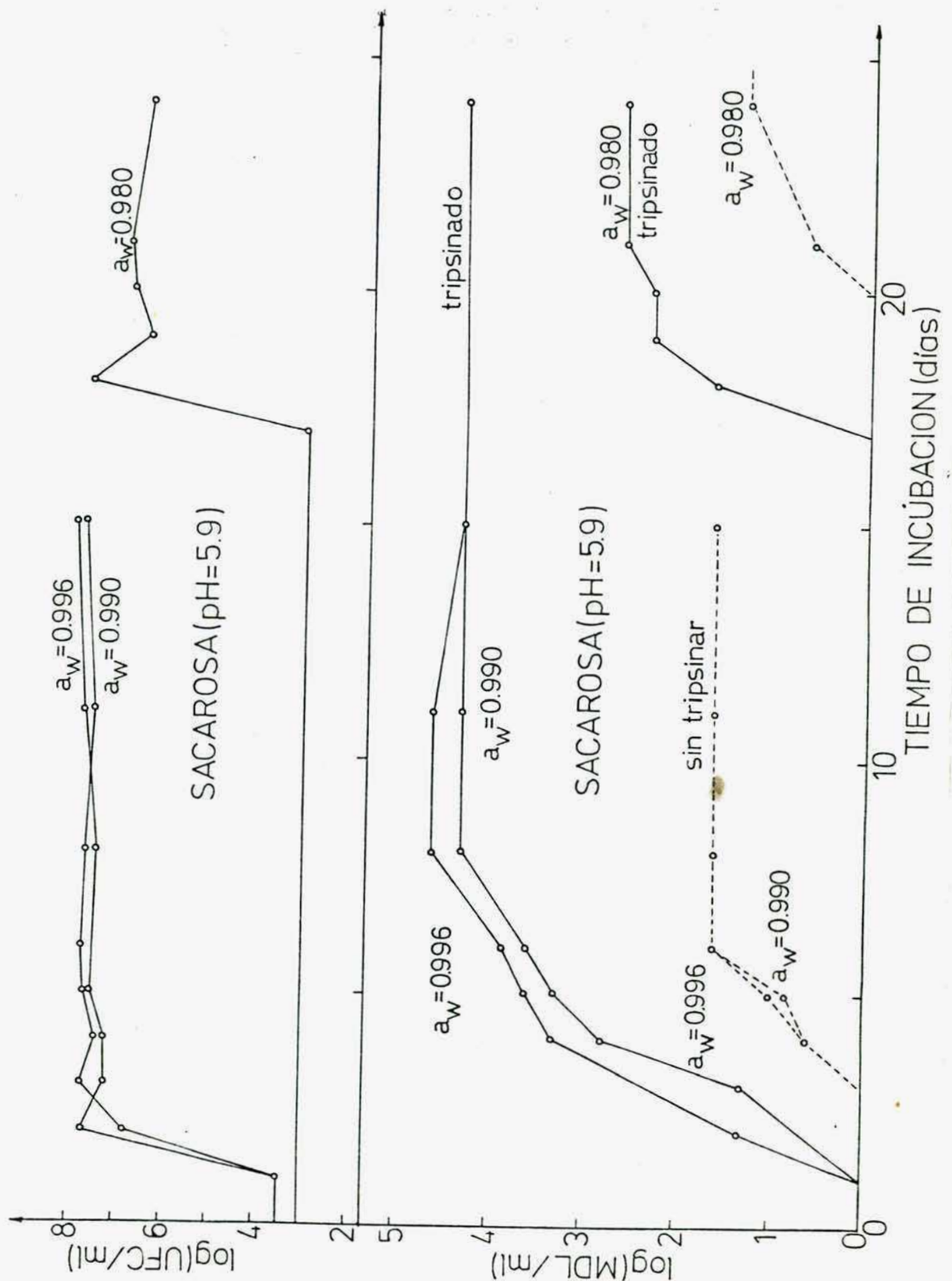


Figura 15: Efecto de la  $a_w$  a pH 5,9 en el crecimiento y la producción de toxina por el C. botulinum tipo G cepa 89, incubado a 32°C.



se aprecia que el título de la toxina obtenida fue entre 130 a 600 veces mayor cuando se realizaba la activación con tripsina que sin ella.

Se puede observar que tanto para las corridas usando NaCl o sacarosa, el óptimo crecimiento y producción de toxina se encuentra a  $a_w$  0,990 para cualquiera de los pH investigados, excepto en una ocasión a pH 5,9 y  $a_w$  ajustado con sacarosa en que el título de toxina a  $a_w$  0,996 fue levemente mayor que a  $a_w$  0,990. Esto concuerda con las investigaciones de Christian y Waltho (1962) que establecieron que "cada bacteria no halofílica que se ha examinado con suficiente cuidado presenta un  $a_w$  óptimo que generalmente cae entre 0,980 y 0,995". Christian (1981) verificó la existencia de dicho máximo para muchas bacterias.

Es importante notar que en las condiciones óptimas de  $a_w$  y pH (0,990-6,9) aquí estudiadas, las concentraciones máximas de células y de toxinas fueron de  $1,6 \times 10^8$  UFC/ml y 200.000 DLM/ml para medios de  $a_w$  ajustada con NaCl, y de  $3,1 \times 10^8$  UFC/ml y 2.000.000 DLM/ml para medios de  $a_w$  ajustada con sacarosa.

La mínima  $a_w$  a la cual se encontró crecimiento y producción de toxina fue de 0,965, ya sea ésta obtenida mediante el agregado de NaCl o de sacarosa. Este valor es similar al de 0,97 reportado en la literatura para el C. botulinum tipo E (Emodi and



Lechowich, 1969; Baird-Parker and Freame, 1967). En consecuencia. el C. botulinum tipo G es bastante más sensible a la reducción de  $a_w$  que los tipos A, B cuyos límites de crecimiento son de  $a_w$  0,94-0,95. Es de hacer notar que cuando se utilizó sacarosa para reducir la  $a_w$  se observó crecimiento a una  $a_w$  de 0,960 (ver Fig-13); sin embargo no se verificó la producción de toxina. Este resultado se ratificó adecuadamente mediante reiterados experimentos posteriores.

Respecto a los límites de pH se puede afirmar que el mínimo valor al cual se obtuvo desarrollo y producción de toxina fue de 5,6 (a la óptima  $a_w$ ). Cabe destacar sin embargo, que a este pH el desarrollo se produjo con extrema dificultad ya que sólo se observó en 2 de 20 tubos inoculados en un primer experimento (a los 10 y 13 días); en otras dos corridas posteriores destinadas a confirmar este resultado no se obtuvo desarrollo en ninguno de los tubos inoculados de este pH (5,6) en 75 días. También se hicieron corridas a pH 5,2 (20 tubos), 5,3 y 5,4 (30 tubos cada una) que no presentaron desarrollo en dos meses y medio. Los dos tubos de pH 5,6 que mostraron desarrollo, presentaron un recuento medio de  $10^6$  UFC/ml y 2000 MDL, ratón/ml. Los resultados del efecto del pH están resumidos en la Tabla 25. El valor mínimo de pH que permite el desarrollo de las esporas de C. botulinum depen-

Tabla 25: Crecimiento y producción de toxina por Clostridium botulinum tipo G a varios pH, incubados a 32°C (ajustado a la  $a_w$  óptima ( $a_w = 0,990$ )).

pH	NaCl	Sacarosa
6,9	+	+
6,5	+	
5,9	+	+
5,6	+(a)	-
5,4	-	
5,3	-	
5,2	-	

+ : desarrollo y producción de toxina

- : sin desarrollo en 2½ meses

(a): 2 tubos sobre 20 inoculados

de de varios factores (Ito y Chen, 1978), tales como tamaño del inóculo, medio de cultivo, número de cepas utilizadas, temperatura, etc. El límite de pH encontrado para la cepa 89 en nuestras condiciones de trabajo, es de 5,6, valor éste bastante superior al reportado para los tipos A, B y E. Este resultado debería confirmarse estudiando otras cepas diferentes a la 89.

Las Figuras 16 y 17 muestran la dependencia del crecimiento y producción de toxina por C. botulinum tipo G con la variación del pH (en el rango 6,9-5,9) a dos niveles de  $a_w$  (ajustada con NaCl).

Las Figuras 18 y 19 muestran en un diagrama tri-dimensional el efecto combinado de la  $a_w$  y del pH en el crecimiento y producción de toxina del C. botulinum tipo G, cepa 89 incubado a 32°C.

#### Cambios morfológicos

Es conocido el hecho de que a medida que un cultivo envejece y sus nutrientes se agotan los microorganismos comienzan a presentar cambios morfológicos. La Figura 20 muestra un cultivo de C. botulinum tipo G incubado 24 horas en TP-PGYC, pH 6,9 y  $a_w$  0,966, y la Figura 21 muestra el mismo cultivo a los 14 días de



Figura 16: Efecto del pH a  $a_w$  0,990 en el crecimiento y la producción de toxina por el C. botulinum tipo G, cepa 89, incubado a 32°C.

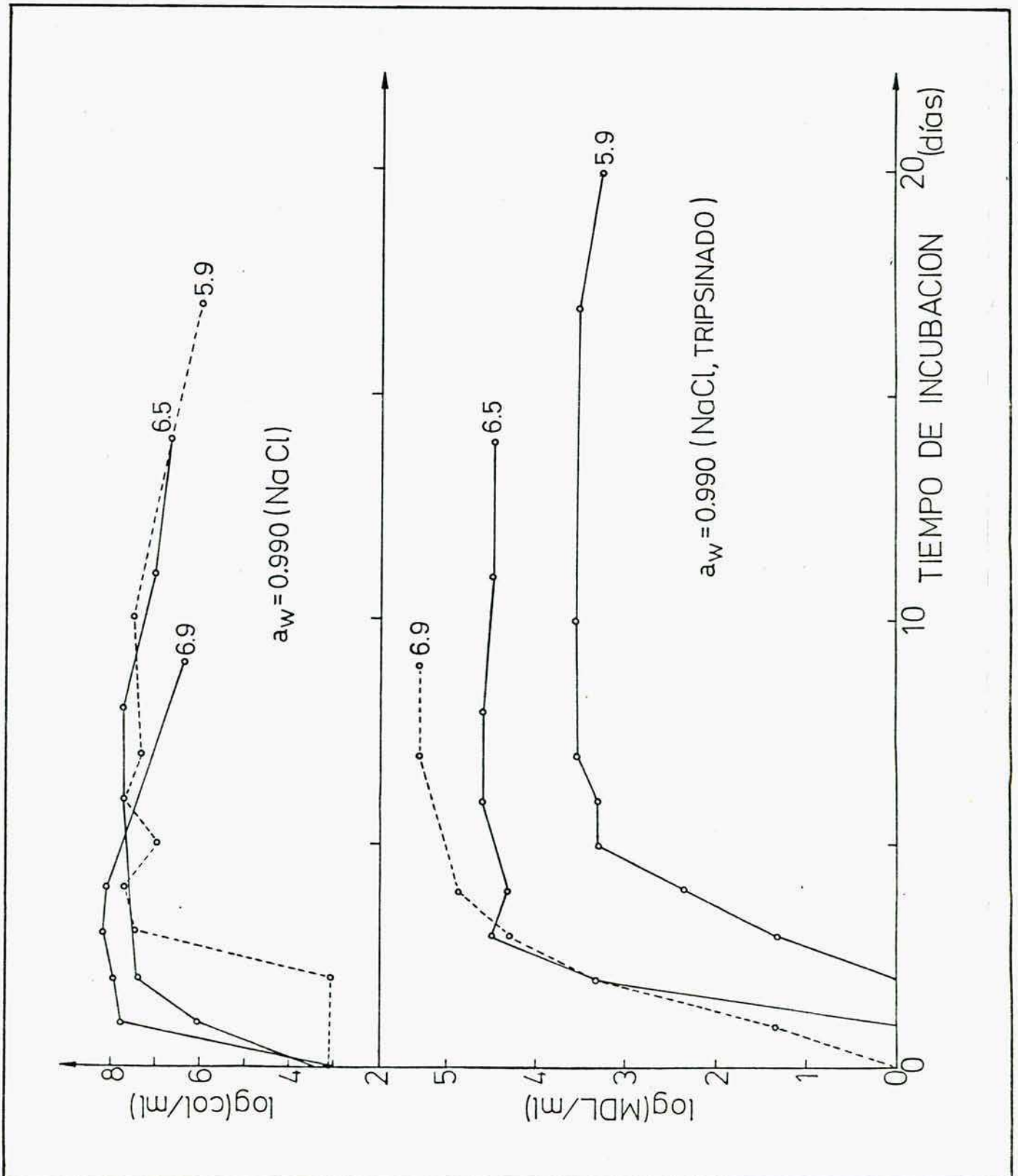


Figura 17: Efecto del pH a  $a_w$  0,980 en el crecimiento y la producción de toxina por el C. botulinum tipo G, cepa 89, incubado a 32°C.

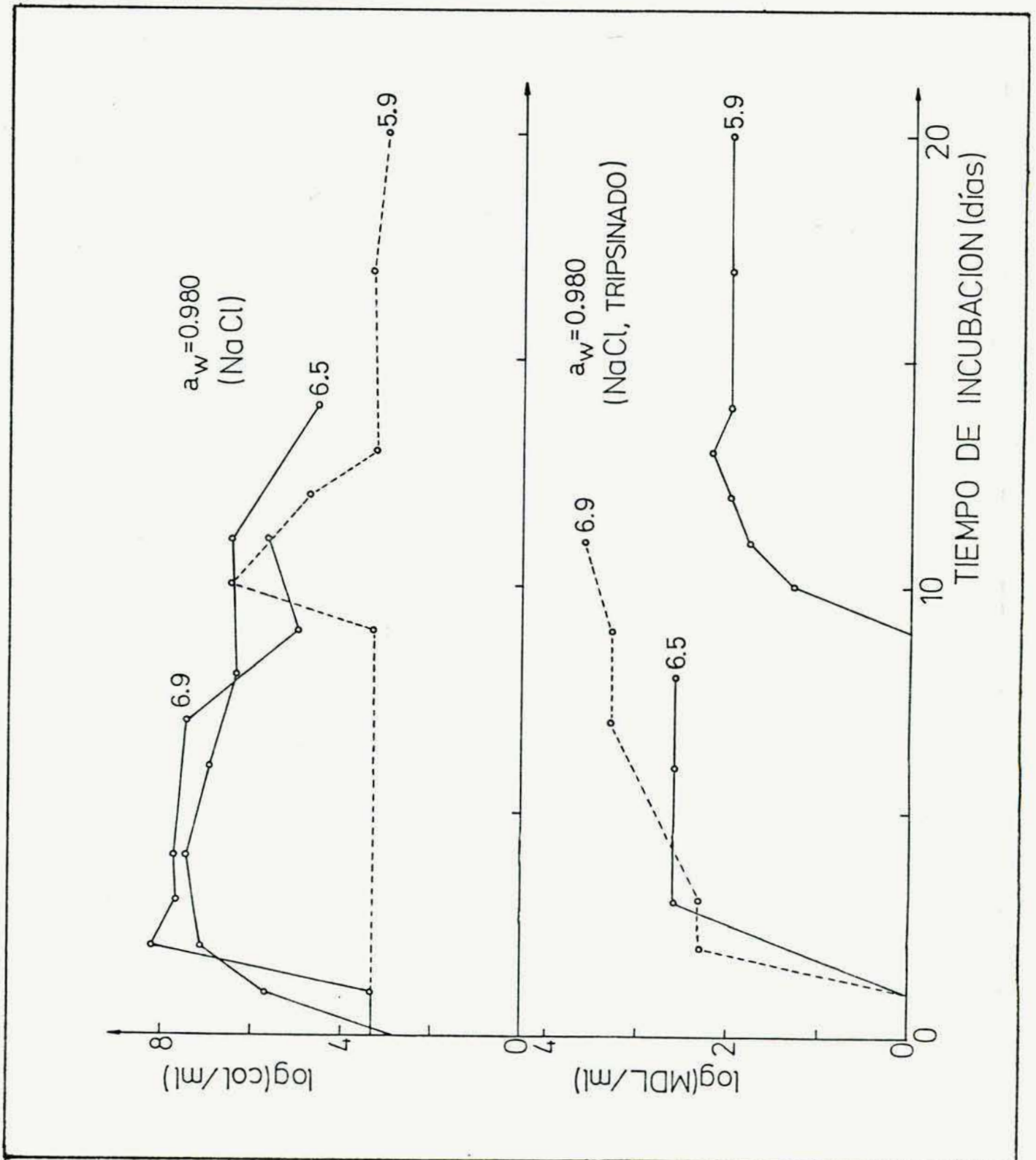


Figura 18: Efecto combinado de la  $a_w$  y el pH en el desarrollo de la cepa 89 de C. botulinum tipo G a 32°C.

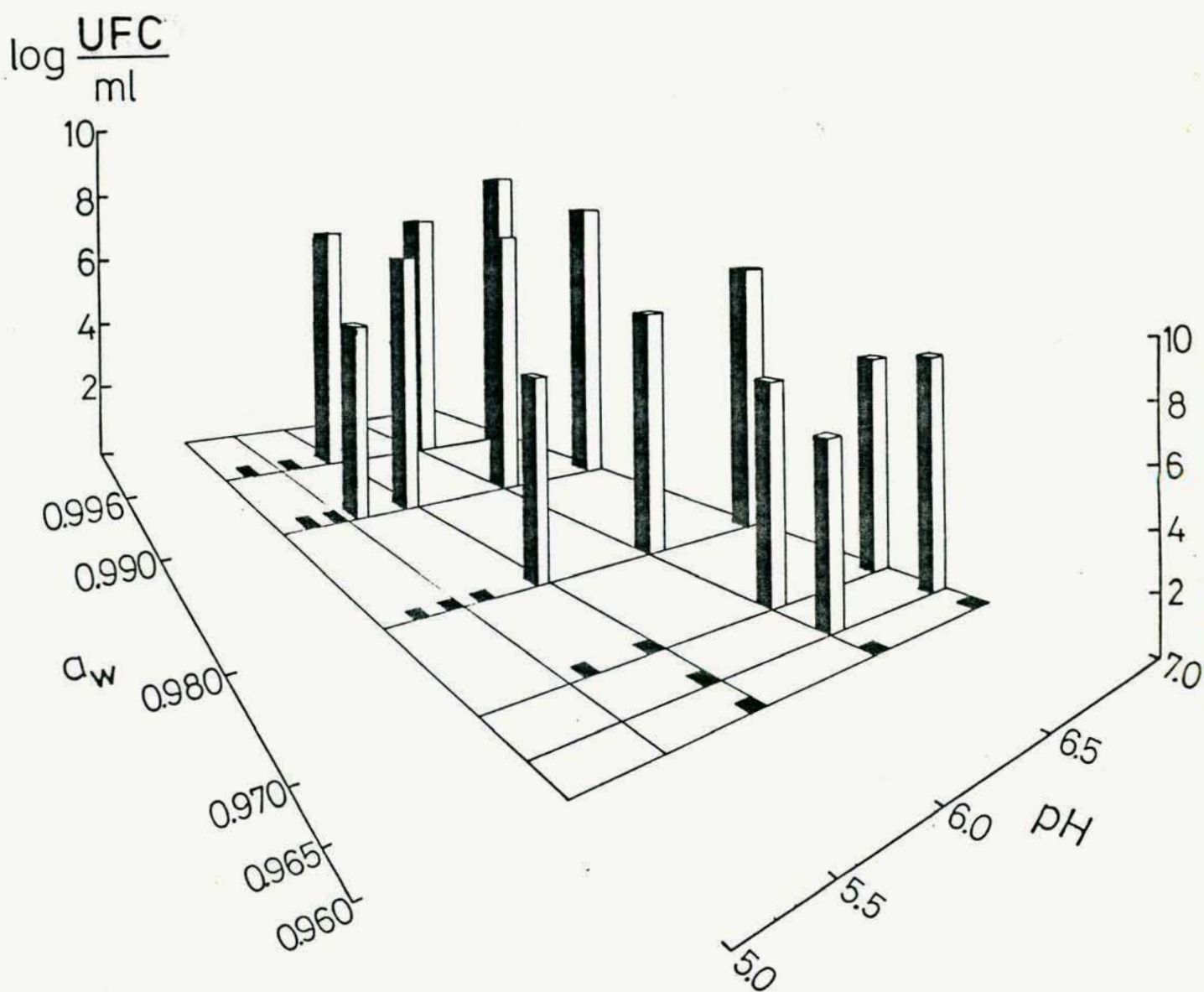




Figura 19: Efecto combinado de la  $a_w$  y el pH en la producción de toxina por la cepa 89 de C. botulinum tipo G a 32°C.

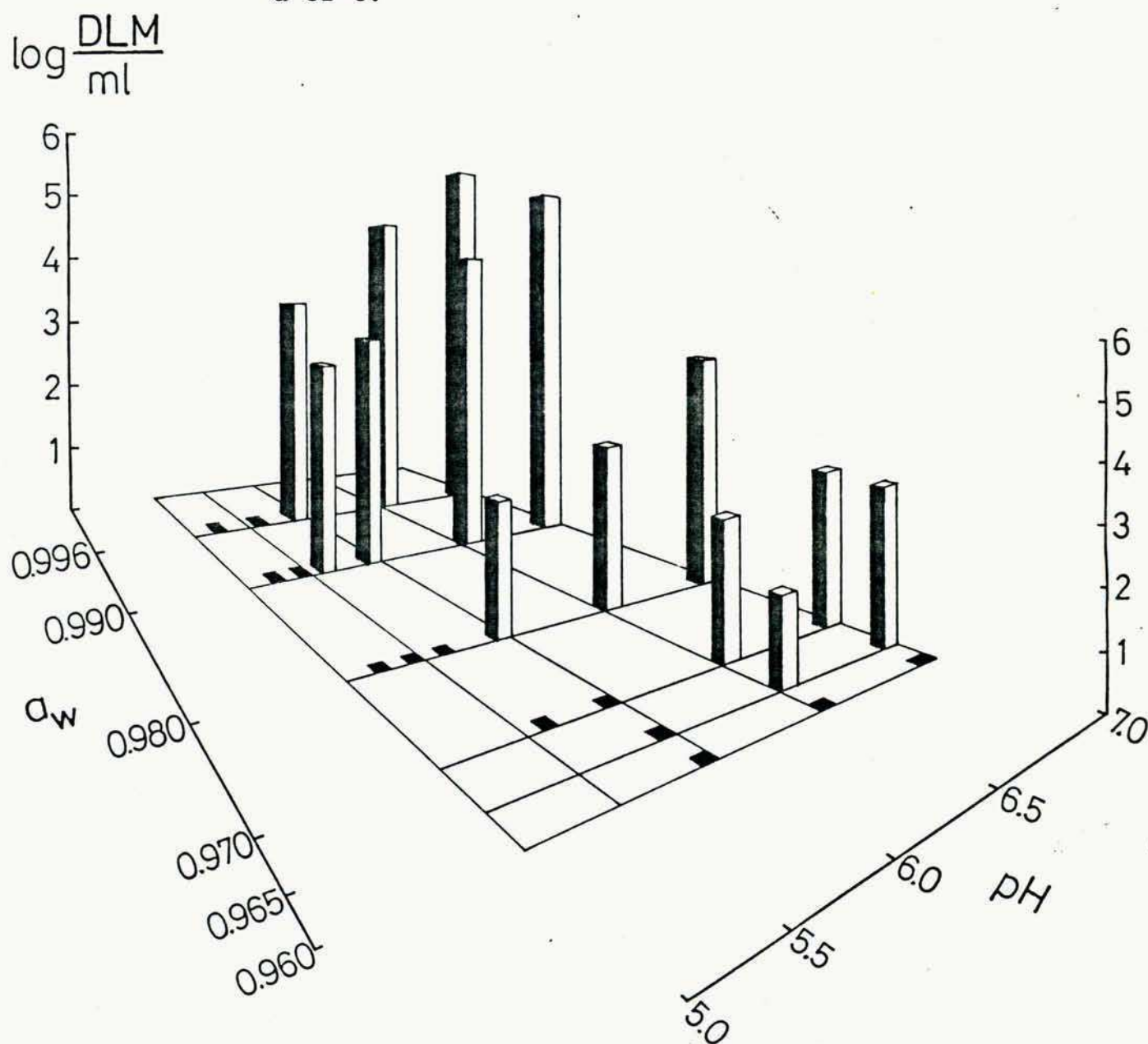


Figura 20: C. botulinum tipo G de 24-48 horas cultivado en TP-PGYC de  $a_w$  0,990, pH 6,9. Cada división representa 1,2  $\mu\text{m}$ .

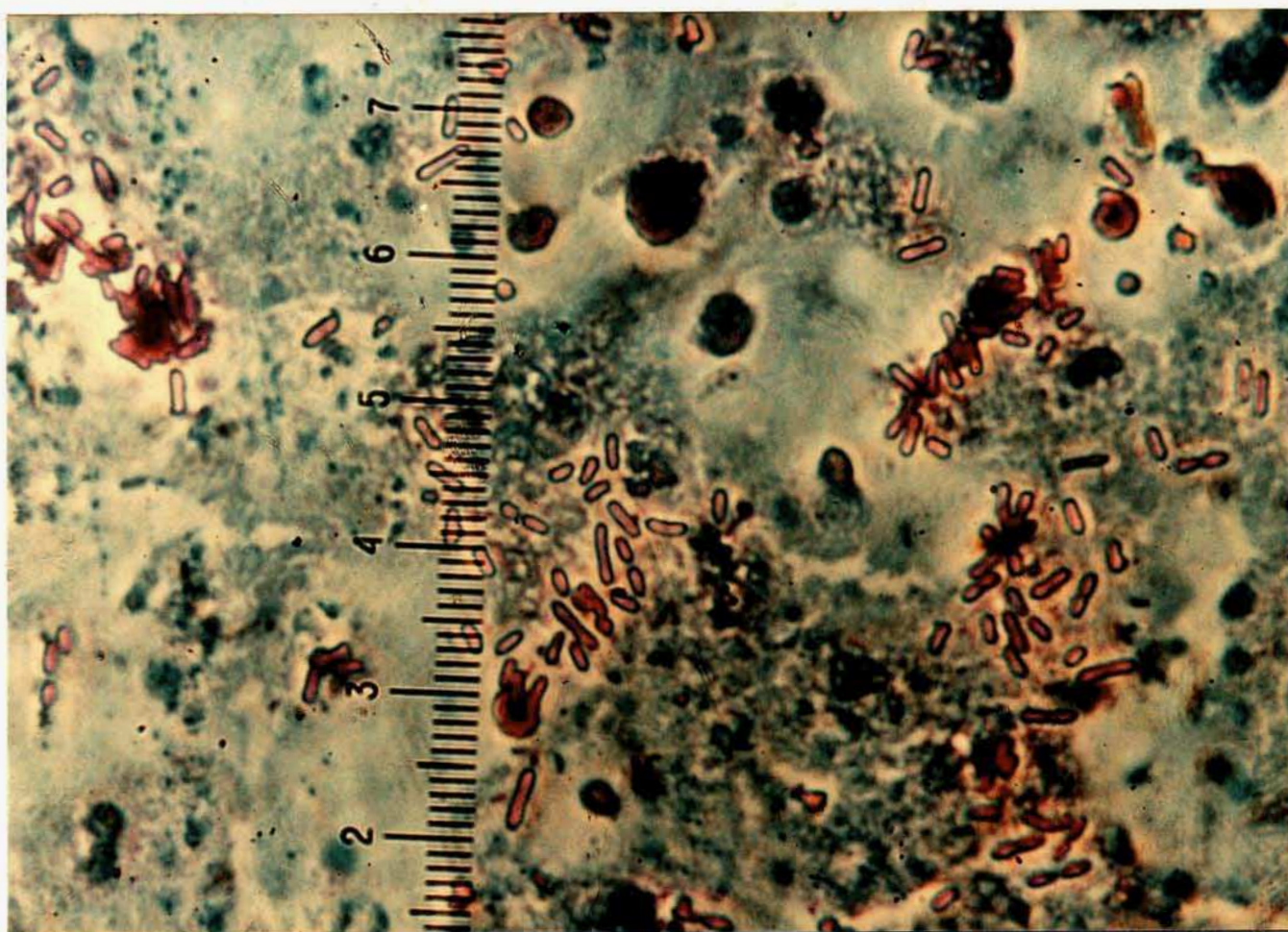
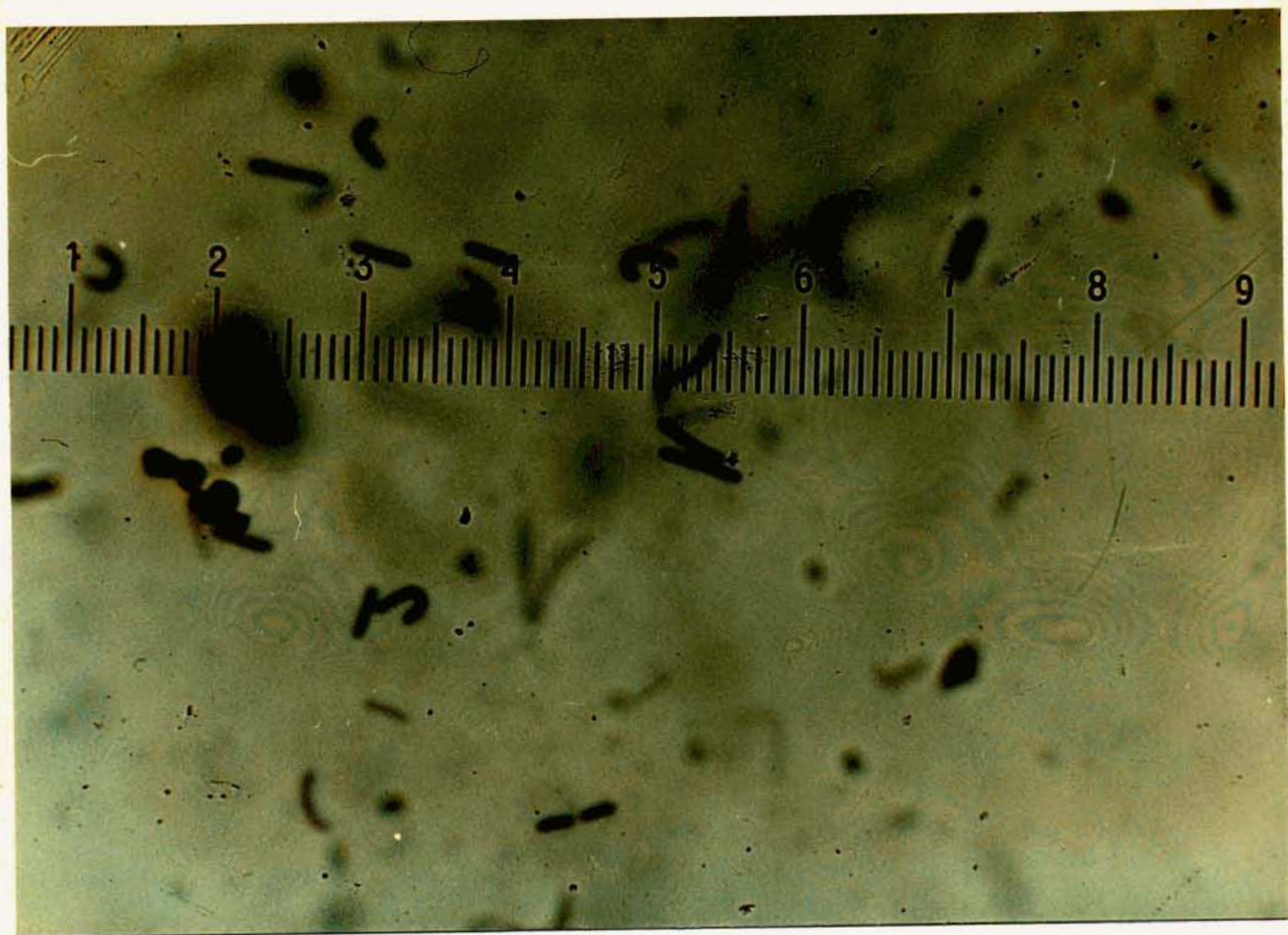




Figura 21: C. botulinum tipo G de 14 días, cultivado en TP-PGYC de  $a_w$  0,990, y pH 6,9, a 32°C. Son abundantes los bacilos curvos. Cada división representa 1,2  $\mu\text{m}$ .





desarrollo. Se aprecia claramente como en este último caso aparecen formas bacilares curvadas, en contraste con los bacilos rectos que se aprecian en el cultivo "joven" (Fig. 20). Estas observaciones coinciden con las de Smith (1977) que describe formas bacilares curvadas de 20 a 45  $\mu\text{m}$  para el Clostridium botulinum, cuando crece en medios no excesivamente ricos; estas formas curvadas son notoriamente más largas que los bacilos normales (2-10  $\mu\text{m}$  de longitud). En el presente trabajo se observó que al reducir la  $a_w$  y/o el pH las deformaciones bacilares del C. botulinum tipo G aumentaban en intensidad y ocurrían en forma más temprana. La Figura 22 ( $a_w$  0,990; pH 5,6) muestra bacilos extremadamente largos que forman verdaderas madejas. La Figura 23 muestra un cultivo de  $a_w$  0,960 (ajustado con sacarosa) y pH 6,9; además de bacilos muy largos se aprecia aquí la formación de cadenas. El mismo resultado se observó a  $a_w$  0,965 e idéntico pH. A partir del tercer día de desarrollo las coloraciones de Gram de estos medios mostraron bacilos lisados (Figura 24) y esto concuerda con el comienzo de la etapa de declinación en la curva de desarrollo (Fig. 13).

La Figura 25 muestra un bacilo esporulado de C. botulinum tipo G en medio Tarozzi.

Figura 22: C. botulinum tipo G de 72 horas, cultivado en TP-PGYC de  $a_w$  0,990, (ajustado con NaCl) y pH 5,6 a 32°C. Se observa que los bacilos son extremadamente largos y tortuosos. Cada división representa 2,08  $\mu\text{m}$

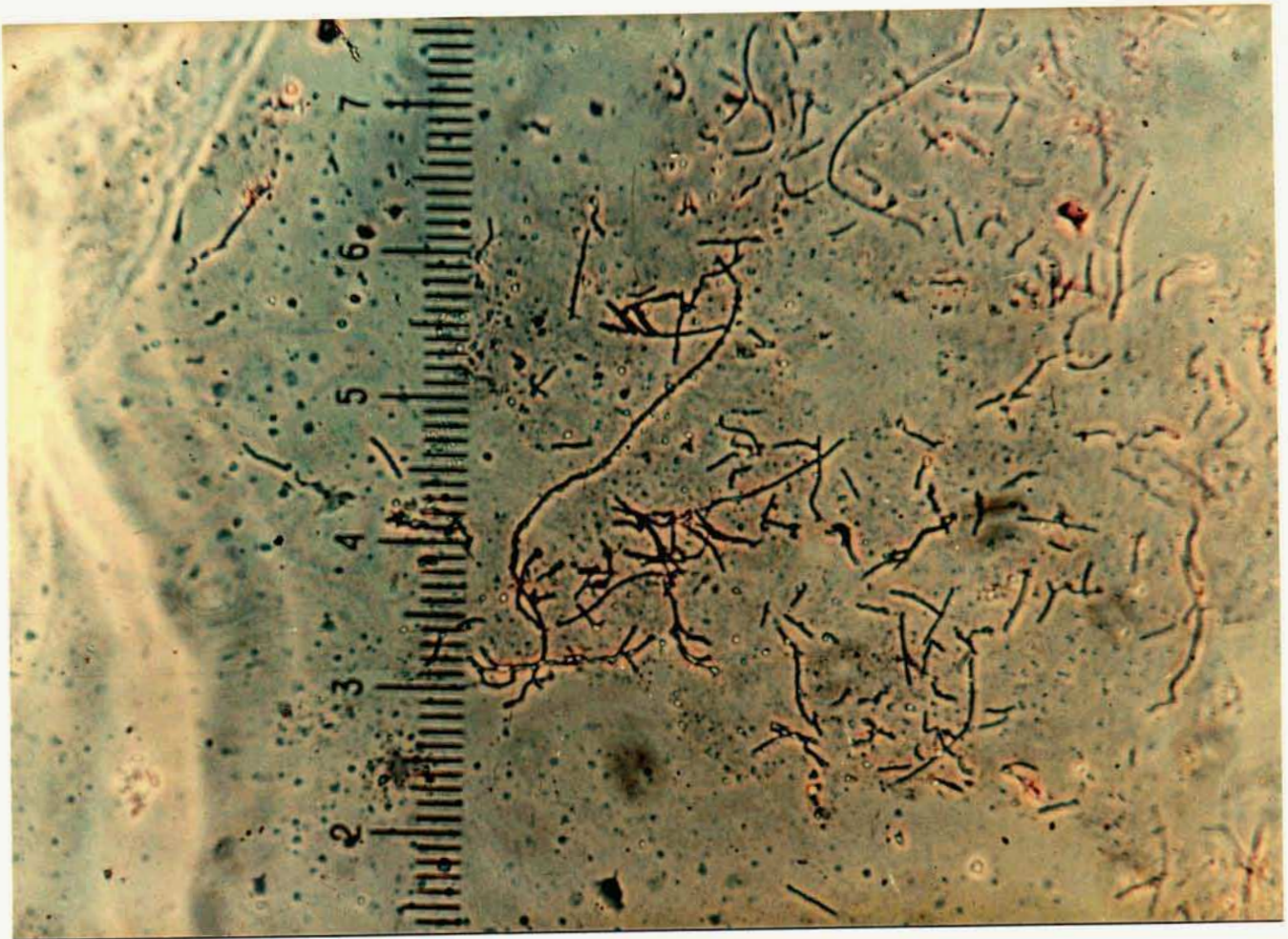




Figura 23: C. botulinum tipo G, de 48 horas cultivado en TP-PGYC, de  $a_w$  0,960 (ajustado con sacarosa) y pH 6,9. Es notable la formación de cadenas. Cada división equivale a  $1,2 \mu\text{m}$

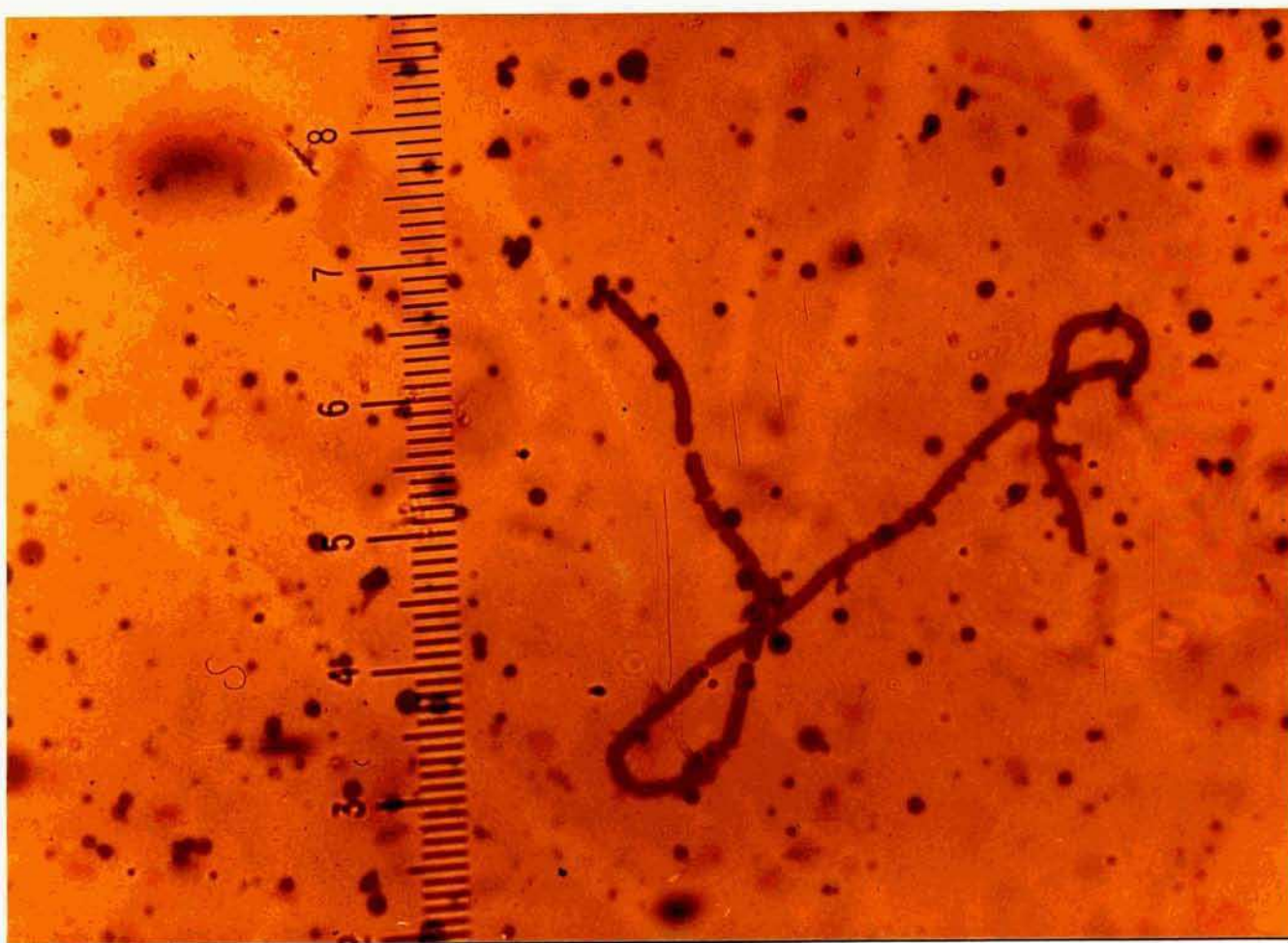
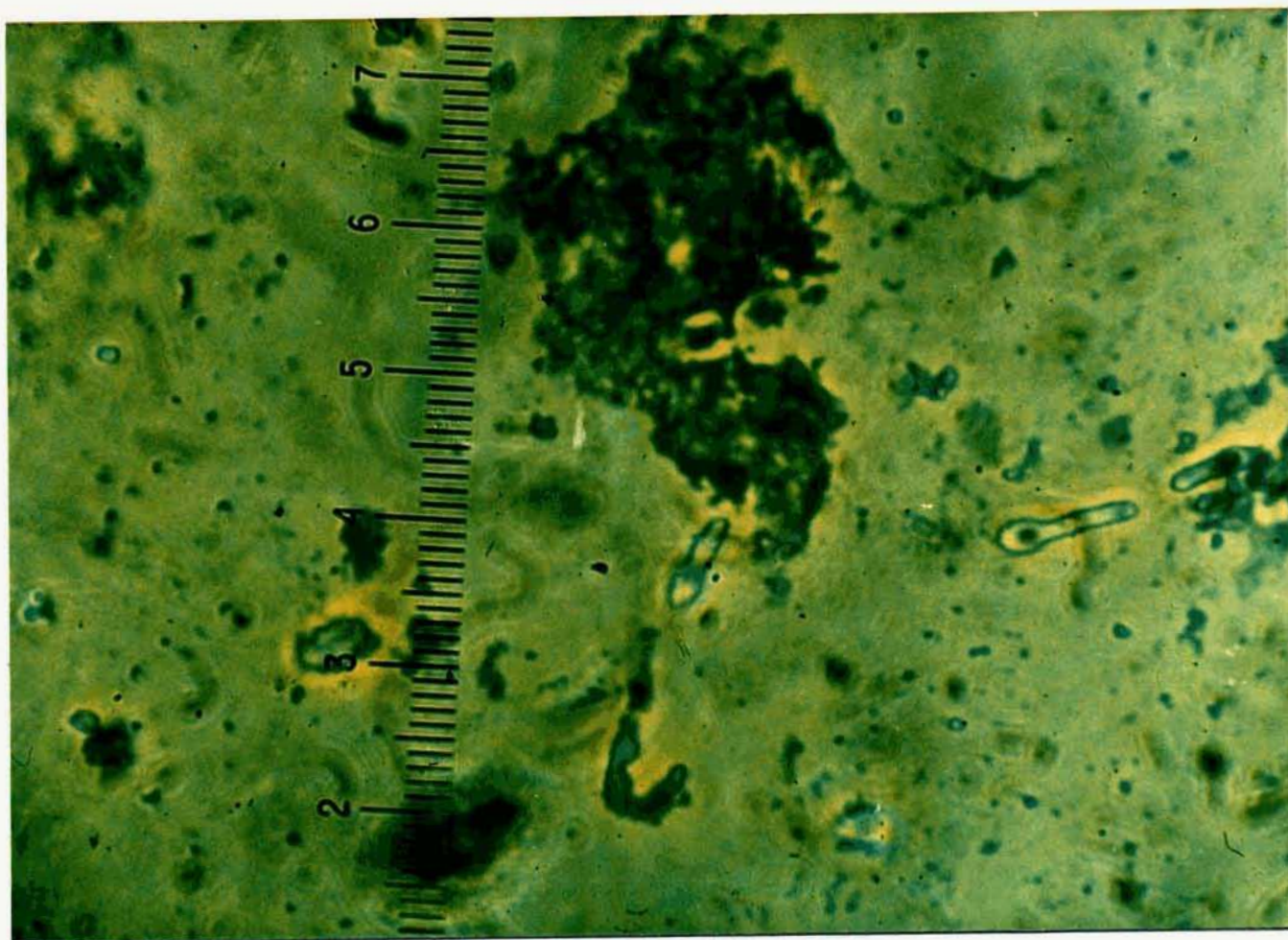




Figura 24: C. botulinum tipo G, de 3 días cultivado en TP-PGYC, de  $a_w$  0,960 (ajustado con sacarosa) y pH 6,9 a 32°C. Se observa que algunos bacilos de la cadena están li-  
sados. Cada división equivale a 1,2  $\mu$ m



Figura 25: C. botulinum tipo G, esporulado en medio Tarozi a 32°C. Cada división equivale a 1,2  $\mu\text{m}$



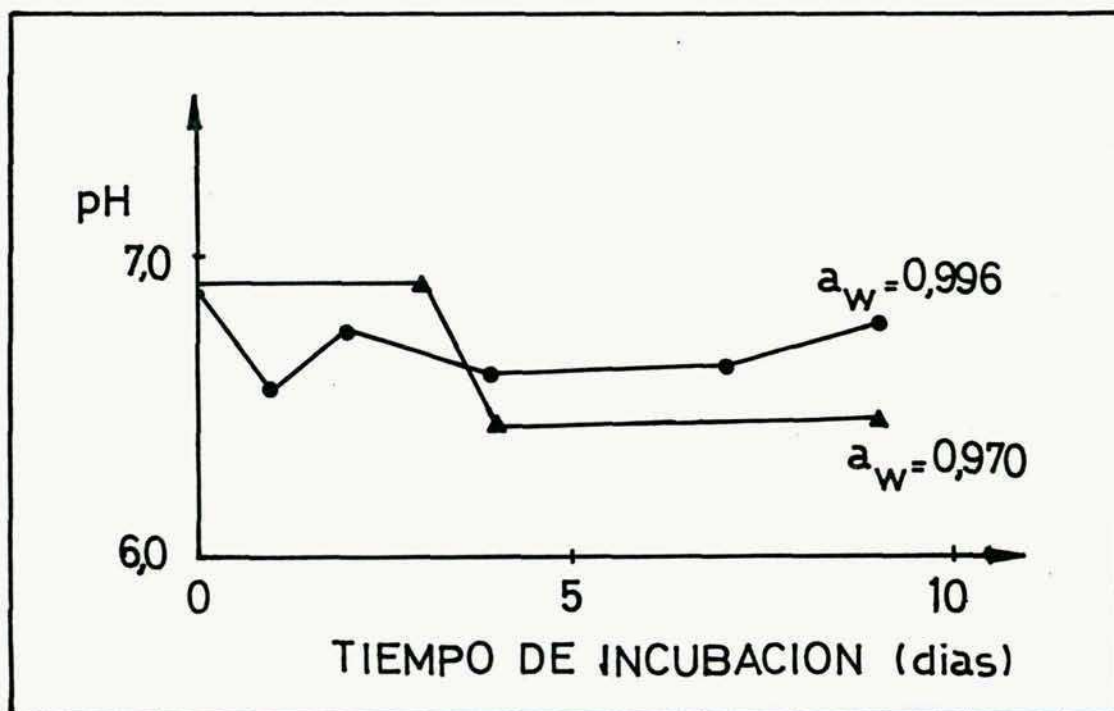


Modificación del pH producida por el desarrollo del microorganismo

En todos los casos en que se observó desarrollo, simultáneamente se produjo un descenso de 0,2-0,4 unidades de pH. El primer caso (0,2) ocurría cuando el pH original del medio era bajo (por ejemplo 5,9) y el segundo (0,4 unidades de pH) para pH mayor que 6,0. Si el desarrollo se había producido en condiciones desfavorables para el microorganismo, es decir que comenzaba la etapa de muerte inmediatamente después de alcanzada la máxima concentración de gérmenes el pH quedaba fijo en ese valor más bajo, pero si los microorganismos continuaban viables se producía un aumento leve de pH a partir del segundo día. Esto puede verse en la Figura 26 para la corrida a pH 6,9 (ajustado con NaCl) y valores de  $a_w$  0,996 y 0,970.



Figura 26: Modificación del pH del TP-PGYC producida por el desarrollo de la cepa 89 de C. botulinum tipo G, a 32°C



## CONCLUSIONES DE LA PARTE II

Del presente trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones referentes al C. botulinum tipo G, cepa 89:

- a) Se observó una abundante esporulación en medio Tarozzi y en BHI (Brain Heart Infussion) incubados a 32°C. En VL-agar, en superficie, se obtuvo más del 80% de esporas.
- b) La suspensión de esporas de C. botulinum tipo G, cepa 89, en solución fisiológica (producidas en medio Tarozzi) mantuvo su viabilidad y concentración ( $5,0 \times 10^6$  esporas/ml) durante 2 años, mantenidas a una temperatura de 4-6°C.
- c) Se encontró que un "shock" térmico de 10 minutos a 75°C no favorecía (ni tampoco perjudicaba) el recuento de colonias, tanto si el shock se realizaba en TP-PGYC a pH 5,6 o 6,9, como en solución fisiológica. A pesar de ello, en todos los experimentos de este trabajo se utilizó el shock térmico tal como es la práctica universal aceptada para otros tipos de C. botulinum.
- d) Los estudios realizados confirmaron la necesidad de activar

la toxina con tripsina, fijándose las condiciones óptimas para ello: 0,1% de tripsina, pH 6,5, incubación a 37°C durante 45 minutos.

- e) En condiciones óptimas de  $a_w$  y pH (0,990-6,9) y a una temperatura de 32°C, las concentraciones máximas observadas de células y de toxina botulínica fueron del orden de  $10^8$  UFC/ml y de 2.000.000 DLM/ml, respectivamente.
- f) La mínima  $a_w$  a la cual se encontró crecimiento y producción de toxina a 32°C fue de 0,965 ya sea ésta obtenida mediante el agregado de NaCl o sacarosa.
- g) El mínimo valor de pH al cual se encontró crecimiento y producción de toxina a una temperatura de 32°C fue de 5,6.

Estos resultados son los primeros que se consignan en la literatura a nivel mundial y son un aporte al conocimiento del comportamiento de C. botulinum tipo G en condiciones dadas de  $a_w$  y pH. Tienen particular importancia a los efectos de la protección de alimentos procesados contra el desarrollo y producción de toxina por esta bacteria.



Tanto el NaCl como la sacarosa son dos solutos ampliamente usados en la industria alimentaria, en particular el NaCl, del cual podemos decir que es un aditivo común a numerosísimos alimentos procesados. Dado que éstos generalmente tienen un pH inferior a la neutralidad, y que podrían admitir alguna reducción posterior de éste, los resultados del presente trabajo son de importancia a los efectos de predecir si existe o no posibilidad de desarrollo de este nuevo tipo de Clostridio, y también ajustar las condiciones de  $a_w$  y pH del alimento para que esto no ocurra.

El control de la  $a_w$  de los alimentos será cada vez más importante a medida que se desarrollen nuevos productos y que se utilicen métodos de procesamiento con un aprovechamiento más eficiente de la energía. Es importante que como tecnólogos alimentarios aprendamos a medir y controlar la actividad de agua y comprendamos su influencia en la microbiología de los alimentos que se producen.



TABLAS DE DATOS DE LA PARTE II

$a_w$  0,996 ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina			
				Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,90	$1,0 \times 10^3$	3,00	--	--	--	--
1	6,54	$4,7 \times 10^6$	6,67	20	1,30	--	--
2	6,75	$7,7 \times 10^7$	7,89	2.000	3,30	20	1,30
3		$1,3 \times 10^8$	8,11	20.000	4,30	200	2,30
4	6,60	$9,0 \times 10^7$	7,95	70.000	4,84	200	2,30
7	6,63			150.000	5,17	400	2,60
9	6,76	$5,7 \times 10^7$	7,56	150.000	5,17	400	2,60



$a_w$  0,990 (NaCl) ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina			
				Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,9	$1,1 \times 10^3$	3,04	--	--	--	--
1	6,49	$6,0 \times 10^7$	7,78	20	1,30	--	--
2	6,70	$9,1 \times 10^7$	7,96	2.000	3,30	20	1,30
3		$1,6 \times 10^8$	8,20	20.000	4,30	200	2,30
4	6,54	$1,3 \times 10^8$	8,11	70.000	4,84	200	2,30
7	6,7			200.000	5,30	400	2,60
9	6,7	$2,3 \times 10^6$	6,36	200.000	5,30	400	2,60

$a_w$  0,980 (NaCl) ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	6,90	$2,9 \times 10^3$	3,34	--	--	--
2		$1,6 \times 10^8$	8,20	200	2,30	--
3		$4,5 \times 10^7$	7,65	200	2,30	--
4	6,49	$5,4 \times 10^7$	7,73	400	2,60	--
7	6,40	$2,7 \times 10^7$	7,43	2.000	3,30	20 1,30
9	6,60	$1,0 \times 10^5$	5,00	2.000	3,30	30 1,48
11		$5,0 \times 10^5$	5,69	4.000	3,60	30 1,48

$a_w$  0,970 (NaCl) ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina			
				Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,90	$8,0 \times 10^2$	2,90	--	--	--	--
4	6,43	$5,0 \times 10^6$	6,69	20	1,30	--	--
7	6,44	$8,0 \times 10^4$	4,9	200	2,30	--	--
9	6,46	$1,3 \times 10^3$	3,11	200	2,30	--	--
11		$1,6 \times 10^3$	3,20	300	2,47	3	0,48



$a_w$  0,965 (NaCl) ; pH 6,94

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	log (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log (DLM/ml)
0	6,94	$4,2 \times 10^3$	3,62	--	--	--
8	6,97	$1,4 \times 10^5$	5,15	--	--	--
9		$5,0 \times 10^5$	5,70	4	0,60	--
11	6,61	$2,0 \times 10^7$	7,30	40	1,60	--
12	6,52	$1,1 \times 10^7$	7,04	400	2,60	--
13		$1,0 \times 10^6$	6,00	400	2,60	--
15	6,54	$3,2 \times 10^6$	6,50	200	2,30	--
24		$6,0 \times 10^4$	4,78	400	2,60	--

$a_w$  0,966 (NaCl) ; pH 6,5

Tiempo				Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,50	$2,5 \times 10^3$	3,40	--	--	--	--
1	6,26	$8,0 \times 10^6$	6,90	20	1,30	--	--
2	6,33	$1,0 \times 10^7$	7,00	20.000	4,30	20	1,30
3	6,61			20.000	4,30	200	2,30
4	6,43	$1,2 \times 10^7$	7,08	30.000	4,48	110	2,04
6	6,36	$7,0 \times 10^6$	6,84	20.000	4,30	40	1,60
8	6,58	$1,7 \times 10^7$	7,23	30.000	4,48	120	2,08
11	6,36	$2,6 \times 10^6$	6,41	30.000	4,48	200	2,30
14	6,68	$4,0 \times 10^6$	6,70	30.000	4,48	200	2,30

$a_w$  0,990 (NaCl) ; pH 6,5

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	log (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log (DLM/ml)
0	6,50	$2,2 \times 10^3$	3,34	--	--	--
1	6,08	$1,0 \times 10^6$	6,00	--	--	--
2	6,31	$2,6 \times 10^7$	7,41	2.000	3,30	20 1,30
3	6,65			30.000	4,48	20 1,30
4	6,33	$4,2 \times 10^7$	7,62	20.000	4,30	20 1,30
6	6,33	$7,0 \times 10^6$	7,84	40.000	4,60	20 1,30
8	6,62	$3,0 \times 10^7$	7,48	40.000	4,60	100 2,00
11	6,37	$1,2 \times 10^7$	7,08	30.000	4,48	100 2,00
14	6,70	$5,1 \times 10^6$	6,70	30.000	4,48	100 2,00



$a_w$  0,980 (NaCl) ; pH 6,50

Tiempo (días)	Toxina				
	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Tripsinado (DLM/ml) log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	6,50	$7,3 \times 10^2$	2,86	--	--
1	6,37	$5,0 \times 10^5$	5,70	--	--
2	6,10	$1,3 \times 10^7$	7,11	20	1,30
3	6,35			400	2,60
4	6,24	$3,1 \times 10^7$	7,49	400	2,60
6	6,19	$9,0 \times 10^6$	6,95	400	2,60
8	6,42	$2,3 \times 10^6$	6,36	400	2,60
11	6,20	$3,0 \times 10^5$	5,48	400	2,60
14	6,37	$4,1 \times 10^4$	4,61	400	2,60
28		$5,0 \times 10^2$	2,70		--

$a_w$  0,970 (NaCl) ; pH 6,5

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	6,50	$1,1 \times 10^3$	3,04	--	--	--
4	6,14	$1,0 \times 10^7$	7,00	20	1,30	--
6	6,12	$1,1 \times 10^7$	7,04	20	1,30	--
8	6,20	$3,8 \times 10^4$	4,58	40	1,60	--
11	6,11	$2,3 \times 10^3$	3,36	200	2,30	--
14	6,18	$2,6 \times 10^3$	3,41	100	2,00	--
28		$2,4 \times 10^1$	1,38	200	2,30	--

$a_w$  0,965 (NaCl) ; pH 6,5

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml)	log(DLM/ml)
0	6,50	$1,8 \times 10^3$	3,25	--	--	--
8		$1,9 \times 10^3$	3,28	--	--	--
14	6,51	$2,2 \times 10^3$	3,34	--	--	--
28		$1,3 \times 10^6$	6,10	12	1,08	--
29		$9,0 \times 10^5$	5,95	20	1,30	--
31		$1,2 \times 10^4$	4,08	30	1,48	--
37				30	1,48	--



$a_w$  0,996 ; pH 5,90

Tiempo		Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Tripsinado (DLM/ml) log (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log (DLM/ml)
0	5,88	$3,2 \times 10^3$	3,50	--	--
3	5,67	$1,7 \times 10^7$	7,23	--	--
4	5,75	$1,8 \times 10^7$	7,25	20	1,30
5	5,82	$5,0 \times 10^6$	6,70	110	2,04
6	5,79	$6,0 \times 10^5$	5,78	200	2,30
7	5,75	$1,5 \times 10^5$	5,18	200	2,30
10	5,86	$8,0 \times 10^5$	5,90	1.200	3,08
13	5,91	$2,6 \times 10^5$	5,41	1.000	3,00
17	6,17	$1,0 \times 10^5$	5,00	3.000	3,48
20	6,03	$2,0 \times 10^5$	5,30	2.000	3,30
					4
					15
					0,60
					1,12
					0,60

$a_w$  0,990 (NaCl) ; pH 5,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina			
				Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	5,87	$1,2 \times 10^3$	3,08	--	--	--	--
3	5,69	$2,9 \times 10^7$	7,46	20	1,30	--	--
4	5,78	$5,0 \times 10^7$	7,70	200	2,30	--	--
5	5,86	$9,0 \times 10^6$	6,95	2.000	3,30	--	--
6	5,98	$4,9 \times 10^7$	7,69	2.000	3,30	--	--
7	5,89	$2,3 \times 10^7$	7,36	4.000	3,60	4	0,60
10	5,97	$3,2 \times 10^7$	7,50	4.000	3,60	40	1,60
13	5,95			4.000	3,60	40	1,60
17	6,31	$1,2 \times 10^6$	6,08	4.000	3,60	40	1,60
20	6,09	$5,8 \times 10^5$	5,76	2.000	3,30	20	1,30

$a_w$  0,980 (NaCl) ; pH 5,90

Tiempo		Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Tripsinado (DLM/ml) log (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log (DLM/ml)
0	5,87	$2,1 \times 10^3$	3,32	--	--
10	5,65	$3,4 \times 10^6$	6,53	20 1,30	--
11		$4,0 \times 10^5$	5,60	60 1,78	--
12	5,64	$6,5 \times 10^4$	4,74	100 2,00	--
13	5,64	$1,8 \times 10^3$	3,25	150 2,18	--
14	5,64	$2,3 \times 10^3$	3,36	100 2,00	--
17	5,66	$2,5 \times 10^3$	3,39	100 2,00	--
20	5,65	$1,3 \times 10^3$	3,11	100 2,00	--



$a_w$  0,996 ; pH 6,9

Tiempo			Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Tripsinado (DLM/ml)	log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	6,84	$1,5 \times 10^3$	3,18	--	--	--
1	6,54	$3,9 \times 10^8$	8,59	200	2,30	3 0,48
2	6,40	$1,3 \times 10^8$	8,11	20.000	4,30	20 1,30
3	7,03	$2,4 \times 10^8$	8,38	150.000	5,17	40 1,60
4	7,05	$1,4 \times 10^8$	8,15	400.000	5,60	400 2,60
7	7,16	$2,7 \times 10^7$	7,43	400.000	5,60	400 2,60
11	7,16	$2,1 \times 10^7$	7,32	700.000	5,84	300 2,48
15	7,30	$1,7 \times 10^7$	7,23	400.000	5,60	300 2,48

$a_w$  0,990 (Sacarosa) ; pH 6,9

Tiempo				Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,91	$1,6 \times 10^3$	3,20	--	--	--	--
1	6,56	$3,4 \times 10^8$	8,53	2.000	3,30	4	0,60
2	6,44	$6,0 \times 10^7$	7,78	40.000	4,60	40	1,60
3	6,98	$1,5 \times 10^8$	8,18	200.000	5,30	200	2,30
4	6,88	$1,0 \times 10^8$	8,00	1.000.000	6,00	700	2,84
7	7,21	$3,1 \times 10^8$	8,49	1.500.000	6,18	400	2,60
11	6,86	$4,1 \times 10^7$	7,61	2.000.000	6,30	400	2,60
15	7,15	$1,6 \times 10^7$	7,20	400.000	5,60	400	2,60

$a_w$  0,980 (Sacarosa) ; pH 6,9

Tiempo		Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Tripsinado (DLM/ml) log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	6,87	$1,5 \times 10^3$	3,18	--	--
1	6,75	$7,7 \times 10^6$	6,89	--	--
2	6,36	$1,7 \times 10^8$	8,23	200 2,30	--
3	6,74	$8,0 \times 10^6$	6,90	10.000 4,00	200 2,30
4	6,66	$4,2 \times 10^6$	6,62	20.000 4,30	200 2,30
6	6,86	$2,2 \times 10^7$	7,34	70.000 4,84	300 2,48
7	6,97	$3,2 \times 10^7$	7,50	100.000 5,00	400 2,60
9	7,14	$2,4 \times 10^7$	7,38	--	400 2,60
11	6,72	$1,5 \times 10^7$	7,17	40.000 4,60	400 2,60
15		$1,0 \times 10^6$	6,00		



$a_w$  0,970 (Sacarosa) ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,93	$1,0 \times 10^3$	3,00	--	--	--
3	6,51	$2,0 \times 10^7$	7,30	20	1,30	--
4	6,59	$2,8 \times 10^7$	7,45	100	2,00	--
6	6,78	$4,6 \times 10^6$	6,66	200	2,30	0,48
7	6,81	$2,3 \times 10^6$	6,36	200	2,30	0,60
9	6,87	$4,0 \times 10^5$	5,60	200	2,30	0,60
11	6,66	$1,8 \times 10^5$	5,25	200	2,30	0,60
15		$6,0 \times 10^3$	3,78			
23					10	1,00

$a_w$  0,965 (Sacarosa) ; pH 6,9

Tiempo				Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	6,90	$1,1 \times 10^3$	3,04	--	--	--	--
6	6,55	$1,2 \times 10^7$	7,08	20	1,30	--	--
7	6,48	$6,9 \times 10^6$	6,84	20	1,30	--	--
8	6,61	$1,5 \times 10^6$	6,18	30	1,48	--	--
9	6,63	$6,0 \times 10^5$	5,78	20	1,30	--	--
11	6,50	$1,2 \times 10^5$	5,08	70	1,84	--	--
14	6,65	$3,3 \times 10^3$	3,52	70	1,84	--	--
15		$7,0 \times 10^2$	2,84			--	--

$a_w$  0,960 (Sacarosa) ; pH 6,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml)	log(DLM/ml)
0	6,93	$2,2 \times 10^2$	2,34	--	--	--
9	6,50	$5,7 \times 10^6$	6,76	--	--	--
10	6,69	$1,6 \times 10^6$	6,20	--	--	--
11	6,55	$1,2 \times 10^6$	6,08	--	--	--
14	6,63	$1,4 \times 10^4$	4,15	--	--	--
15		$1,2 \times 10^3$	3,08	--	--	--



$a_w$  0,996 ; pH 5,9

Tiempo				Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	5,95	$2,9 \times 10^3$	3,46	--	--	--	--
2	5,80	$6,0 \times 10^7$	7,78	20	1,30	--	--
3	5,86	$1,5 \times 10^7$	7,18	200	2,30	--	--
4	5,92	$1,7 \times 10^7$	7,23	2.000	3,30	4	0,602
5	5,95	$3,5 \times 10^7$	7,54	4.000	3,60	10	1,00
6				7.000	3,84	40	1,60
8	6,01	$2,6 \times 10^7$	7,41	40.000	4,60	40	1,60
11	6,09	$5,2 \times 10^7$	7,72	40.000	4,60	40	1,60
15	6,38	$9,0 \times 10^7$	7,95	20.000	4,30	40	1,60
24	6,24			20.000	4,30		

$a_w$  0,990 (Sacarosa) ; pH 5,9

Tiempo				Toxina			
(días)	pH	UFC/ml	log (UFC/ml)	Tripsinado		Sin tripsinar	
				(DLM/ml)	log (DLM/ml)	(DLM/ml)	log (DLM/ml)
0	5,92	$3,0 \times 10^3$	3,48	--	--	--	--
2	5,83	$6,0 \times 10^6$	6,78	--	--	--	--
3	5,72	$5,2 \times 10^7$	7,72	20	1,30	--	--
4	5,80	$2,5 \times 10^7$	7,40	1.500	3,18	4	0,60
5	5,87	$4,4 \times 10^7$	7,64	2.000	3,30	7	0,84
6		$6,0 \times 10^7$	7,78	4.000	3,60	40	1,60
8	6,04	$4,6 \times 10^7$	7,66	20.000	4,30	40	1,60
11	6,09	$3,1 \times 10^7$	7,49	20.000	4,30	40	1,60
15	6,49	$6,0 \times 10^7$	7,78	20.000	4,30	40	1,60

$a_w$  0,980 (Sacarosa) ; pH 5,9

Tiempo (días)	pH	UFC/ml	log(UFC/ml)	Toxina		
				Tripsinado (DLM/ml)	log(DLM/ml)	Sin tripsinar (DLM/ml) log(DLM/ml)
0	5,92	$1,0 \times 10^3$	3,00	--	--	--
18	5,81	$4,6 \times 10^7$	7,66	40	1,60	--
19	5,85	$2,2 \times 10^6$	6,34	200	2,30	--
20	5,82	$5,8 \times 10^6$	6,76	200	2,30	--
21	5,82	$6,8 \times 10^6$	6,83	400	2,60	4 0,60
24	5,90	$2,3 \times 10^6$	6,36	400	2,60	20 1,30
29		$1,4 \times 10^6$	6,15	1.000	3,00	20 1,30



BIBLIOGRAFIA

- Abrahamson, K., B. Gullmar, and N. Molin (1966). The effect of temperature on toxin formation and toxin stability of Clostridium botulinum type E in different environments. Can. J. Of Microbiol. 12: 385-394.
- Amato de Lagarde, E. et Beerens H. (1970). Contribution a l'étude de la formation de toxine botulique dans les conserves de fruits. Ann. Inst, Pasteur Lille 21:231-254.
- Amato de Lagarde, E. (1974). Boletín Informativo del Centro Panamericano de Zoonosis, Buenos Aires, Argentina. Vol. 1.
- Amato de Lagarde, E. (1976). "Epidemiología del botulismo". Simposio sobre Infecciones e Intoxicaciones por Clostridios. Ier. Congreso y IV Jornadas Argentinas de Microbiología. Buenos Aires, Argentina.
- Amato de Lagarde, E. (1985). Informes del Inst. Nac, de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán".

- Ananthaswamy, J. and G. Atkinson (1984). Thermodynamics of concentrated electrolyte mixtures. 4. Pitzer-Debye-Hückel limiting slopes for water from 0 to 100°C and from 1 atm to 1 kbar. J. Chem. Eng. Data 29(1):81-87.
- Anderson, A. W., D.A. Corlet and K. L. Krabbenhoff (1966). The effect of additives on radiation resistance of Clostridium botulinum in meat. p 76-78. In "Botulism". M. Meraham and T.A. Roberts (ed.). Chapman and Hall, London.
- Ando, Y. and H. Iida (1970). Factors affecting the germination of spores of Clostridium botulinum type E. Japan J. Microbiol. 14:361.
- A.O.A.C. (1980). Official Methods of the Association of Analytical Chemists Sorbic acid 20.098.
- Baird Parker, A.C., and B. Freame (1967). Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of Clostridium botulinum from spore and vegetative cell inocula. J. Appl. Bact. 30(3):420-429.

- Baird Parker, A.C. (1971). Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins. J. Appl. Bacteriol. 34:181.
- Benedict, R.C. (1980). Biochemical bases of nitrite inhibition of Clostridium botulinum in cured meats. Journal of Food Protect. 43: 877-891.
- Bergey's (1974). Manual of determinative Bacteriology, 8th. ed. Buchanan and Gibbons (eds.). William Comp. Baltimore, Md. pp 551-572.
- Blocher, J.C., F.F. Busta and J. N. Sofos (1982). Influence of potassium sorbate and pH on ten strains of type A and B Clostridium botulinum. J. Food Sci. 47:2028-2032.
- Bonventre, P.F. and K.L. Kempe (1959). Physiology of toxin production by Clostridium botulinum types A and B. III. Effect of pH and temperature during incubation on growth, autolysis and toxin production. Appl. Microbiol. 7: 374-377.



- Boylan, S.L., K.A. Acott, and T.P. Labuza (1976). S. aureus challenge study in a intermediate moisture food. J. Food Sci. 41:918.
- Boor, Treselt and Shantz (1955). Effect of salts and colloids on the potency of botulinum toxin. Proc. Soc. Expl. Biol.. Med. 89: 270-272.
- Briozzo, J. (1982). Crecimiento de Clostridium botulinum tipo A y producción de toxina en sistemas modelo y quesos fundidos para untar Tesis de Magister Scientiae; C.I.C. (La Plata, Pcia de Buenos Aires, Argentina). p 75. .
- Briozzo, J., E. Amato de Lagarde, J. Chirife and J.L. Parada (1983). Clostridium botulinum type A growth and toxin production in media and process cheese spread. Appl. Env. Microbiol. 45: 1150-1152.
- C.D.C. (1974 a). Botulism-Alabama Center for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Reporte 23 (10): 90.

///

C.D.C. (1974 b). Botulism-Idaho, Utah Center for Disease Control.  
Morbidity and Mortality Weekly Report 23(27): 241.

C.D.C. (1979). "Botulism in the United States, 1899-1977".  
Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory  
workers. U.S. Dept. of Health, Education and Welfare.

Chichister, D.F. and F.W. Tanner (1972). Antimicrobial Food  
Aditives. In "Handbook of Food Aditives". T.E. Furia  
(ed.) CRC Press.

Chirife, J. And Ferro Fontán, C. (1980). Prediction of water  
activity of aqueous solutions in connection with  
intermediate moisture foods: Experimental investigation  
of the  $a_w$  lowering behavior of sodium lactate and some  
related compounds. Journal of Food Science, 45: 802-804.

Chirife, J., C. Ferro Fontán, and E.A. Benmergui (1980). The  
prediction of water activity in aqueous solutions in  
conection with intermadiate moisture foods. IV:  $a_w$   
prediction in aqueous non electrolyte solutions. J Food  
Technol. 15: 59-70.

///

Chirife, J. G. Favetto and O. Scorza (1982). The water activity of common liquid bacteriological media. J. Appl. Bacteriol. 53: 219-222.

Chirife, J., Favetto, G., Ferro Fontán, C. and Resnik, S. (1983). The water activity of standard saturated salt solutions in the range of intermediate moisture foods. Lebensmittel-Wissenschaft-Technologie, 16: 36-38.

Chirife, J. and S. Resnik (1984). Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. J. Food Sci. 49: 1486-1488.

Chirife, J., G. Favetto, and C. Ferro Fontán (1984). Microbial growth at reduced water activities: some physicochemical properties of compatible solutes. J. Appl. Bact. 56: 259-268.

Christian, J.H.B. and J. A. Waltho. (1962). The water relations of staphilococci and micrococci. J. Appl. Bacteriol. 25: 369-377.

///



Christian, J.H.B., and Stewart (1973). Survival of Staphylococcus aureus, Salmonella newport in dried foods, as influenced by water activity and oxigen. In "The microbial safety of foods". B.C. Hobbs and J.H.B. Christian (eds.). Academic Press, NY.

Christian, J.H.B. (1981). Specific solute effects on microbial water realtions. In "Water activity: Influence on food quality". Edited by L.B. Rockland and G.F. Stewart p 825-854. Academic Press.

Ciccarelli, A.S., D.N. Whaley, L.M. Mc Kroskey, D.F. Giménez, V.R. Dowell and C.L. Hatheway (1977). Cultural and Physiological Characteristics of Clostridium botulinum type G. and the susceptibility of certain animals to its toxin. Appl. Env. Microbiol. 34: 834-848.

Ciccarelli, A.S., D.F. Giménez y R.A. Fernandez (1982). Aspectos epidemiológicos del botulismo en Argentina. 1922-1981. Del Libro de Resúmenes del III Congreso Argentino de Microbiología. 1-5 de agosto de 1982. Bs.As., Argentina.

///

- Ciccarelli, A.S., D.F. Giménez y R.A. Fernandez (1983). Human botulism in Argentina. Com. Biol. (Bs.As.) 1: 479-480.
- Cockey, R.R., and M.C. Tatro (1974). Survival study with Clostridium botulinum type E spores in pasteurized meat of the blue crab Callinectes sapidus. App. Microbiol. 27: 629-633.
- Corry, J.E.L. (1971). The water relations and heat resistance of microorganisms.; B.F.M.I.R.A. Scientific and Technical Surveys N° 73.
- Denny, C.B., D.J. Goeke and R. Sternberg (1969). Inoculation tests of Clostridium botulinum in canned bread with specific reference to water activity. Res. Rep. N°4-69, Natl. Canners Assoc., Washington D.C.
- Deuel, H.J., Jr. R. Alfin-Slater, C.S. Weil and H.F. Smyth Jr. (1954). Sorbic acid as fungistatic agent for foods. I. Harmlessness of sorbic acid as a dietary component. Food Res. 19: 1-12.

Dozier, C.C. (1924). Optimum and limiting hydrogen ion concentration for Bacillus botulinus and quantitative estimation of its growth XVI. J. Infect. Dis. 35: 105-133.

Duff, J.T., G.G. Wright, and A. Yarinsky (1956). Activation of Clostridium botulinum type E toxin by trypsin. J. Bacteriol. 72: 455-460.

Eklund, M.W. and F.T. Poyosky (1965). Clostridium botulinum type F from marine sediments. Science 149: 306.

Eklund, M.W., D.I. Wieler and F.T. Poyosky (1967 a). Outgrowth and toxin production of non proteolytic type B Clostridium botulinum at 3.3 to 5.6°C. J. Bacteriol. 93: 1461-1462.

Eklund, M.W., F.T. Pyosky, and D.I. Wieler (1967 b). Characteristics of Clostridium botulinum type F isolated from the Pacific coast of the USA. Appl. Microbiol. 15: 1316.

///



- Eklund, M.W., F.T. Poyosky, J.A. Meyers, and G.A. Pelroy (1974). Interspecies conversion of Clostridium botulinum type C to Clostridium novyi type A by bacteriophage. Science 186: 456-458.
- Emodi, A.S. and R.V. Lechowich (1969). Low temperature growth of type E. Clostridium botulinum spores. 2. Effects of solutes and incubation temperature. J. Food Sci. 34: 82.
- Favetto, G., Resnik, S., Chirife, J. and Ferro Fontán, C. (1983). Statistical evaluation of water activity measurements obtained with the Vaisala Humicap humidity meter. Journal of Food Science, 48: 534-538.
- Ferro Fontán, C., E.A. Benmergui and J. Chirife (1980) The prediction of water activity of aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods. III.  $a_w$  Prediction in multicomponent strong electrolyte aqueous solutions. J. Food Technol. 15: 14.
- Ferro Fontán, C. and J. Chirife (1981). The evaluation of water activity in aqueous solutions from freezing point depression. J. Food Tecnol. 16: 21-30.

Food and Drug Administration (1978). Bacteriological analytical manual, 5th ed. Assoc. of Official Anal. Chemists. Washington, D.C.

Gibbard, H.F., Jr., G. Scatchard, R.A. Rousseau and J.L. Creek. (1974). Liquid vapor equilibrium of aqueous solution of NaCl from 298 to 373°K and from 1 to 6 mol/kg, and related properties. J. Chem. and Engng. Data 19: 281.

Giménez, D.F. y A.S. Ciccarelli (1970 a). Distribución de Clostridium botulinum en Mendoza, Argentina, Boletín Of. Sanit. Panamer. 69: 505-510.

Giménez, D.F. and A.S. Ciccarelli (1970 b). Another type of Clostridium botulinum. Zentralbl. Bakterio. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. 215: 221-224.

Giménez, D.F. y A.S. Ciccarelli (1976). Clostridium botulinum en Argentina: Presente y futuro. Revista de la Asoc. Arg. de Microbiología, 8(2): 82-91.

- Giménez, D.F., and A.S. Ciccarelli (1978). New strains of Clostridium botulinum. Subtype A<sub>f</sub>. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240: 215-220.
- Giménez, D.F., A.S. Ciccarelli, and R.A. Fernandez (1982). Mal de aguapey: aislamiento de Clostridium botulinum tipos D y A. del libro de Resúmenes del III Congreso Argentino de Microbiología. 1-5 de agosto de 1982, Buenos Aires, Argentina.
- Giménez, D.F., A.S. Ciccarelli y R.A. Fernandez (1985). Subtipos de Clostridium botulinum en el botulismo humano. Libro de Resúmenes del IV Congreso Argentino de Microbiología (n° C30).
- Giulietti de Rigo, A.M. (1973). Prevalencia de Clostridium botulinum en los suelos de las provincias de San Luis y Córdoba. Tesis Fac. Cs. Físico-Químico-Matemáticas, UN San Luis.
- Gould, G.W. and J.C. Measures (1977). Water relation in single cells. Phil. Trans. Royal Soc. London 278:151.



- Gould, G.W. (1985) Present state of knowledge of  $a_w$  on microorganisms. In "Properties of water in foods". D. Simatos and J.L. Multon (eds.). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Grecz, N., Wagenaar, R.O., and Dack, G.M. (1965). Storage stability of Clostridium botulinum toxin and spores in processed cheese. Applied microbiology, 13(6): 1014-1022.
- Grecz, N., and L.H. Arvay (1982). Effect of temperature on spore germination and vegetative cell growth of Clostridium botulinum. Appl. Env. Microbiol. 43:331-337.
- Greenberg, R.A., H.H., Sillicker, and L.D. Fatta (1959). The influence of sodium chloride on toxin production and organoleptic breakdown in perishable cured meats inoculated with Clostridium botulinum. Food Tech. 13: 509-511.
- Hammer, W.J. and Y.C. Wu (1972). Osmotic coefficients and mean activity coefficients of uni-univalent electrolytes

in water at 25°C. J.Phys. Chem. Ref. Data 1: 1047.

Hauschild, A.H.W., B.J. Aris and R. Hilsheimer (1975).

Clostridium botulinum in marinated products. Can.

Inst. Food Sci. Technol. J. 8: 84.

Hauschild, A.W.H., and R. Hilsheimer (1979). Effect of salt

content and pH on toxigenesis by Clostridium botulinum

in caviar. J. Food Protect. 42: 245.

Holdeman, L.V. and L.D. Smith (1965). A study on the nutritional

requeriments and toxin production by Clostridium

botulinum type F. Can J. Microbiol. 11: 1009-1019.

Holdeman, L.V. and W.W.C. Moore (1973). Anaerobe Laboratory

Manual. 2nd. Ed. Virginia Polytechnic Inst. and State

Univ. Blacksburg.

Huhtanen, C.N., J. Naglisky, C.S. Custer and R.W. Russel (1976).

Growth and toxin production by Clostridium botulinum

in moldy tomato juice. Appl. Env. Microbiol. 32: 711-715.

///

- Huhtanen, C.N., F.B. Talley, J. Feinberg, and J.G. Phillips (1981). Flavour and antibotulinal evaluation of sorbic acid-containing bacon. J. Food Sci. 46: 1796-1800.
- Ingram, D.M. and R.H.M. Robinson (1951). The growth of Clostridium botulinum in acid bread media. Proc. Soc. Appl. Bacteriol. 14:62.
- Ito, K.A., D.J. Seslar, W.A. Mercer and K.F. Meyer (1967). The thermal and Chlorine resistance of Clostridium botulinum types A, B and E spores. In "Botulism" Ingram and Roberts (eds.), Chapman and Hall, London.
- Ito, K.A., J.K. Chen, P.A. Lerke, M.L. Seeger, and J.A. Unverferth (1976). Effect of acid and salt concentrations in fresh-pack pickles on growth of Clostridium botulinum spores. Appl. Env. Microbiol. 32: 121-124.
- Ito, K.A. and J.K. Chen (1978). Effect of pH on growth of Clostridium botulinum in foods. Food Technol. 71.

///



Ivey, F.J. and Robach, M.C. (1978). Effect of sorbic acid and sodium nitrite on Clostridium botulinum outgrowth and toxin production in canned comminuted pork. Journal of Food Science, 43: 1782-1785.

Ivey, F.K., K.J. Shaver, L.N. Christiansen and R.B. Tompkin (1978). Effect of potassium sorbate on toxigenesis of Clostridium botulinum in bacon. J. Food Protect. 41: 621.

Karell, M., O. Fennema and D.B. Lund (1977). Principles of Food Preservation.

Kautter, D.A., and R. Lynt (1976). Clostridium botulinum in "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". Prepared by the APHA Intersociety Agency Committe on Microbial Methods for Foods. Marvin L. Speck, Editor. 424-436.

Kautter, D.A., Lilly, T., Lynt, R.K. and Solomon, H.M. (1979). Toxin production by Clostridium botulinum in shelf-stable pasteurized process cheese spreads. Journal of Food Protection, 42(10): 784-786.

- Kautter, D.A., Lynt, R.K., Lilly, Jr., T. and Solomon, H.M.  
(1981). Evaluation of the botulism hazard from imitation  
cheeses. *Journal of Food Science*, 46(3): 749-750.
- Lee, W.H. and H. Rieman. (1970 a). The genetic relatedness of  
proteolytic Clostridium botulinum by DNA composition and  
homology. *J. Gen. Microbiol.* 64: 85-90.
- Lee, W.H. and H. Rieman (1970 b). Correlation of toxic and non  
toxic strains of Clostridium botulinum by DNA composition  
and homology. *J. Gen. Microbiol.* 60: 117-123.
- Leistner, L. and W. Rödel. (1975). The significance of water  
activity for microorganisms in meats. In "Water relations  
of foods", R.B. Ducworths (ed). Academic Press, London,  
N. York. San Francisco, p 309-323.
- Lerke, P. (1973). Evaluation of potential risk from seafood  
cocktails. *Appl. Microbiol.* 25: 807.
- Lewis, G.E. Jr., S. Kulinsky, D.W. Reichard and J.F. Metzger.  
(1981). Detection of Clostridium botulinum type G toxin

by enzyme-linked immunosorbent assay. Appl. Env. Microbiol. 42(6): 1018-1022.

Lück, E. (1976). Sorbic acid as a food preservative. Int. Flavours. May/June: 122-124, 127.

Lund, B.M. and G.M. Wyatt (1984). The effect of redox potential, and its interactions with sodium chloride concentration, on the probability of growth of Clostridium botulinum type E from spore inocula. Food Microbiol. 1: 49-65.

Lynt, R.K., H.M. Solomon, T. Lilly and D.A. Kautter (1977). Thermal death time of Clostridium botulinum type E in meat of the blue crab. J. Food Sci. 42: 1022-1025, 1037.

Lynt, R.K., D.A. Kautter and H.M. Solomon (1979). Heat resistance of non proteolytic Clostridium botulinum type F in phosphate and crabmeat. J. Food Sci. 44: 108-111.

Lynt, R.K., D.A. Kautter and H.M. Solomon (1981). Heat resistance of proteolytic Clostridium botulinum type F in phosphate



buffer and crabmeat. J. Food Sci. 47: 204-206. 230.

Lynt, R.K., H.M. Solomon and D.A. Kautter (1984). Heat resistance of Clostridium botulinum type G in phosphate buffer. J. Food Protec. 47(6): 463-466.

Magrini, R.C., Chirife, J. and Parada, J.L. (1983). A study of Staphylococcus aureus growth in model systems and processed cheese. Journal of Food Science, 48: 882-885.

Marshall, B.J., D.F. Ohye and J.H.B. Christian (1971). Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. Appl. Microbiol. 21: 363.

Measures, J.C. (1975). Role of aminoacids in osmorregulation of nonhalophilic bacteria. Nature 257: 398-400.

Mead, G.C. (1969). Combined effect of salt concentration and redox potential of the medium on the vegetative growth of C. welchii. J. Appl. Bacteriol. 32: 468.

Meyer, K.F. and B. Eddie (1951). Perspectives concerning botulism.

Z. Hyg. Infektionskr. 133: 255.

Meyer, A. (1973). Processed cheese manufacture. Food Trade Press Ltd. London p 78-85 (Previously Published as JOHA<sup>®</sup> Schmelzkäsebuch).

Miracco, J., S.M. Alzamora, J. Chirife and C. Ferro Fontán (1981). On the water activity of lactose solutions. J. Food Sci. 46: 1612-1613.

Montville, T.J. (1983 a). Dependence of Clostridium botulinum gas and protease production on culture conditions. Appl. Env. Microbiol. 45(2): 571-575.

Montville, T.J. (1983 b). Interaction of pH and NaCl on culture density of Clostridium botulinum 62A. Appl. Env. Microbiol. 46: 961-963.

Montville, T.J. (1984). Quantitation of pH and salt tolerant subpopulations from Clostridium botulinum. Appl. Env. Microbiol. 47(1): 28-30.

///

- Norrish, R.S. (1966). An equation for the activity coefficient and relative humidities of water in confectionary syrups. J. Food Technol. 1: 25.
- Notermans, S., J. Dufrene, and M.J.H. Keijbets (1981). Vacuum-packaged cooked potatoes: toxin production by Clostridium botulinum and shelf life. J. Food Protect. 44: 572-575.
- Nylor and Smith (1946). Factors affecting the viability of Serratia marcescens during dehydration and storage. J. Bacteriol. 52: 565-573.
- Odlaug, T.E. and J.J. Pflug (1977). Effect of storage time and temperature on the survival of Clostridium botulinum spores in acid media. Appl. Env. Microbiol. 34(1): 30-33.
- Odlaug, T.E. and I.J. Pflug (1977). Thermal destruction of C. botulinum spores suspended in tomato juice in aluminium thermal death time tubes. Appl. Env. Microbiol. 34: 23-29.
- Odlaug, T.E., I.J. Pflug and D.A. Kautter (1978). Heat resistance of Clostridium botulinum type B spores grown from isolates from commercially canned mushrooms. J. Food Protec.



41: 351-353.

Odlaug, T.E. and I.J. Pflug (1979). Clostridium botulinum growth and toxin production in tomato juice containing Aspergillus gracilis. Appl. Env. Microbiol. 37: 496-504.

Ohye, D.F., and W.J. Scott (1953). The temperature relations of Clostridium botulinum type A and B. Austral. J. Biol. Sci. 6: 178.

Ohye, D.F. and W.J. Scott (1957). Studies on physiology of Clostridium botulinum type E. Aust. J. Biol. Sci. 85: 86-94.

Ohye, D.F. and J.H.B. Christian (1966). Combined effects of temperature, pH and water activity on growth and toxin production by Clostridium botulinum types A, B and E. Proc. 5th. Int. Symp. Food Microbiol. Moscow.

Ohye, D.F., J.H.B. Christian and W.J. Scott (1966). Influence of temperature on the water relations of growth of Clostridium botulinum type E. Proc. 5th. Int. Symp. Food

Microbiol. Moscow. p 136-143.

Olynk, P. and A.R. Gordon (1943). The vapor pressure of aqueous solutions of NaCl at 20, 25 and 30°C for concentrations from 2 molal to saturation. J. Amer. Chem. Soc. 65: 224.

Pitt, J.I., and J.H.B. Christian (1968). Water relations of xerophylic fungi isolated from prunes. Appl. Microbiol. 20: 268.

Pitzer, K.S. (1973). Thermodynamics of electrolytes. 1- Theoretical basis and general equations. J. Phys. Chem. 77: 268.

Pitzer, K.S. and Mayorga, G. (1973). Thermodynamics of electrolytes. 2- Activity and osmotic coefficients for strong electrolytes with one or both ions univalent. J. Phys. Chem. 77: 2300.

Platford, R.F. (1979). Experimental methods: Isopiestic. In "Activity coefficients in electrolyte solutions". (Ed.) R.M. Pytkowicz, p 65, CRC Press, Inc. Florida.

- Prior, B.A., and C.P. Kenyon (1980). Water relations of glucose catabolizing enzymes in Pseudomonas fluorescens. J. Appl. Bact. 48: 211-222.
- Raatjes, G.J.M. and J.P.P.M. Smelt (1979). Clostridium botulinum can grow and form toxin at pH values lower than 4.6. Nature 281(4): 398-399.
- Restaino, L., Komatsu, K.K. and Syracuse, M.J. (1981). Effects of acids on potassium sorbate inhibition of food-related microorganism in culture media. Journal of Food Science 47: 134-138.
- Robach, M.C., F.J. Ivey, and C.S. Hickey (1978). System for evaluation of clostridial inhibition in cured meat products. Appl. Env. Microbiol. 36: 210.
- Robach, M.C. (1980). Use of preservatives to control microorganisms in foods. Food Technol. (October): 81-84
- Roberts, T.A., M. Ingram and S. Skulberg (1965). The resistance of spores of Clostridium botulinum type E to radiation.



J. Appl. Bacteriol. 28: 125-141.

Roberts, T.A. and G. Hobs (1968). Symposium on growth of microorganisms at extremes of temperature: low temperature growth characteristics of clostridia. J. Appl. Bacteriol. 31: 75-88.

Roberts. T.A. and M. Ingram (1973). Inhibition of Clostridium botulinum at different pH values by sodium chloride and sodium nitrite. J. Food Technol. 8: 467.

Roberts. T.A. and J.L. Smart (1976). The occurrence and growth of Clostridium botulinum in vacuum packed bacon with particular reference to C. perfringens and C. botulinum. J. Food Technol. 11: 229-244.

Roberts, T.A., A. Gibson and A. Robinson (1982). Factors controlling the growth of Clostridium botulinum types A and B in pasteurized, cured meats. J. Food Technol. 17: 307-326.

Robinson, R.A. and R.M. Stokes (1965). "Electrolyte solutions".

2nd. ed. (rev) Butterworths, London.

Rockland, L.B. and G.F. Stewart (1981). Water activity: influence on food quality. Academic Press, Inc. NY.

Ross, K.D. (1975). Estimation of water activity in Intermediate Moisture Food. Food Technol., Champaign 13: 715.

Rowley, D.B. and F. Feeherry (1970). Conditions affecting germination of Clostridium botulinum 62A spores in a chemically defined medium. J. Bacteriol. 104: 1151.

Sakaguchi, G. (1983). Clostridium botulinum toxins. Pharm. Ther. 19: 165-194.

Segner, W.P., C.F. Schmidt, and J.K. Boltz (1966). Effect of sodium chloride and pH on the outgrowth of spores of type E Clostridium botulinum at optimal and suboptimal temperatures. Appl. Microbiol. 14: 49.

Seow, C.C. and T.T. Teng (1981). The prediction of water activity of some supersaturated non electrolyte aqueous binary

///

solutions from ternary data. J. Food Technol. 16: 597-607.

Seward, R.A., R. Deibel and R. Lindsay (1982). Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of Clostridium botulinum type E in microcultures. Appl. Env. Microbiol. 44(5): 1212-1221.

Scatchard, G., W.J. Hamer and S.E. Wood (1938). Isotonic solutions. 1- The chemical potential of water in aqueous solutions of sodium chloride, potassium chloride, sulfuric acid, sucrose, urea and glycerol, at 25°C. J. Amer. Soc. 60: 3061.

Scheneider, M.D., N. Grecz and A. Anellis (1963). Sporulation of Clostridium botulinum types A, B, E, Clostridium perfringens and Putrefactive anaerobe 3679 in dialysis sacs. J. Bacteriol. 85: 126-133.

Schmidt, C.F., R.V. Lechowich and J.F. Folinazzo (1961). Growth and toxin production by type E Clostridium botulinum below 40°F. J. Food Sci. 26: 626.

///



- Schmidt, C.F. (1964). Spores of Clostridium botulinum: formation resistance and germination. In "Botulism" Lewis and Cassel (eds.) U.S. Dep. of Health, Education and Welfare. Cincinnati, OH.
- Scott, W.J. (1953). Water relations of Staphylococcus aureus at 30°C. Aust. J. Biol. Sci. 6: 549-564.
- Scott, W.J. (1957). Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Fd. Res. 7: 83-123.
- Silvester, L.F., and K.S. Pitzer (1978). Thermodynamics of electrolytes. X. Enthalpy and the effect of temperature on the activity coefficients. J. Sol. Chem. 7: 324-336.
- Smelt, J.P.P.H., and H. Haas (1978). Behaviour of proteolytic Clostridium botulinum types A and B near the lower limits of growth. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 5: 143.
- Smith, L.S. (1977). "Botulism: the organism, its toxins, the disease". Charles C. Thomas (ed.).

- Smoot, L.A. and M.D. Pierson (1979). Effect of redox potential on the outgrowth and chemical inhibition of Clostridium botulinum 10755A spores. J. Food Sci. 44: 700-704.
- Smoot, L.A. and M. Pierson (1981). Mechanisms of sorbate inhibition of Bacillus cereus T and Clostridium botulinum 62A spore germination. Appl. Env. Microbiol. 42: 477-483.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. and Allen, C.E. (1979 a). Clostridium botulinum control by sodium nitrite and sorbic acid in various meat and soy protein formulations. Journal of Food Science, 44: 1662-1671.
- Sofos, J.N., Busta, F.F. and Allen, C.E. (1979 b). Botulism control by nitrite and sorbate in cured meats: A review. Journal of Food Protection 42(9): 739-770.
- Sofos, J.N., Busta, F.F., Bhothipaksa, K., and Allen, C.E. (1979 c). Sodium nitrite and sorbic acid effects on Clostridium botulinum toxin formation in chicken frankfurter-type emulsions. Journal of Food Science 44: 668-672.

Sofos, J.N., Busta, F.F. and Allen, C.E. (1979 d). Sodium nitrite and sorbic acid effects on Clostridium botulinum spore germination and total microbial growth in chicken frankfurter emulsions during temperature abuse. Appl. Env. Microbiol. 37(6): 1103-1109.

Sofos, J.N. and Busta, F.F. (1980). Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. Food Technology 34(5): 244-251.

Sofos, J.N., F.F. Busta, K. Bhøthipaksa, C.E. Allen, M.C. Robach and M.W. Paquette (1980). Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on Clostridium botulinum toxin production in commercially prepared bacon. J. Food Sci. 45: 234-237.

Sofos, J.N. and Busta, F.F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. Journal of Food Protection 44(8): 614-622.

Solomon, H.M., R.K. Lynt, D.A. Kautter and T. Lilly (1971). Antigenic relationships among the proteolytic and non proteolytic strains of Clostridium botulinum. Appl.



Microbiol. 21: 295-299.

Solomon, H.M., R.K. Lynt, T. Lilly Jr., and D.A. Kautter (1977).  
Effect of low temperatures on growth of Clostridium  
botulinum spores in meat of the blue crab. J. Food Protec.  
40: 5.

Solomon, H.M., and D.A. Kautter (1979). Sporulation and toxin  
production by Clostridium botulinum type G. J. Food Protec.  
42(12): 965-967.

Solomon, H.M., D.A. Kautter and R.K. Lynt (1982). Effect of low  
temperatures on growth of non proteolytic Clostridium  
botulinum types B and F and proteolytic type G in crabmeat  
and broth. J. Food Protect. 45(6): 516-518.

Sonnabend, O., W. Sonnabend, R. Heinzle, R. Dirhofer and U. Krech  
(1981). Isolation of Clostridium botulinum type G and  
identification of type G botulinal toxin in human: report  
of five sudden unexpected death. J. Infect. Dis. 143: 22-27.

Sperber, W.H. (1982). Requirements of Clostridium botulinum for

///

growth and toxin production. Food Technol. (dec 1982):  
89-94.

Sperber, W.H. (1983). Influence of water activity on food-borne  
bacteria. A review. J. Food Protect. 46(2): 142-150.

Stumbo, C.R., J.R. Murphy and J. Cochran (1950). Nature of  
thermal death time curves for PA 3679 and Clostridium  
botulinum. Food Tech. 4: 321-326.

Stumbo, C.R. (1973). Thermobacteriology in food processing, 2nd.  
ed. A. Press, N. York.

Sugii, S. and G. Sakaguchi (1977). Botulogenic properties of  
vegetables with special reference to the molecular size  
of the toxin in them. J. Food Safety 1: 53-65.

Sugiyama, H. and G. King (1972). Isolation and taxonomic  
significance of bacteriophages for non proteolytic  
Clostridium botulinum. J. Gen. Microbiol. 70: 517-525.

Sugiyama, H., K. Mitzutani and K.H. Yang (1972). Basis of type

A and F toxicities of Clostridium botulinum strain 84.  
Proc. Soc. Exp. Biol. (NY) 141: 1063-1067.

Sugiyama, H. (1980). Clostridium botulinum Neurotoxin.  
Microbiological Rev. 44(3): 419-448.

Tanaka, N., N.J. Worley, E.W. Sheldom and J.M. Goepfert (1977).  
Effect of sorbate and sodium acid pyrophosphate on the  
toxin production by Clostridium botulinum in pork  
macerate. pp. 366-368 Ann. Report. Food Res. Inst. Univ.  
Wisconsin.

Tanaka, N., Goepfert, J.M. Traisman, E., and Hoffback, W. (1979).  
A challenge of pasteurized processed cheese spread with  
Clostridium botulinum spores. Journal of Food Protection  
42(10): 787-789.

Tanaka, N. (1982 a). Challenge of pasteurized processed cheese  
spreads with Clostridium botulinum using in-process and  
post-process inoculation. Journal of Food Protection  
45(11): 1044-1050.



- Tanaka, N. (1982 b). Toxin production by Clostridium botulinum in media at pH lower than 4,6. J. Food Protection. 45: 234.
- Tanner, F.W. and W.W. Oglesby (1941). Influence of temperature on growth and toxin production by Clostridium botulinum. Food Res. 6: 481.
- Teng, T. and F. Lenzi (1974). Water activity data representation of aqueous solutions at 25°C. J. of Chem. Eng. 52: 387-391.
- Thatcher, F.S., I.E. Erdman and R.D. Ponefract (1966). Some laboratory and regulatory aspects of the control of Clostridium botulinum in processed foods. In "Botulism" M. Merham and T.A. Roberts (eds.). Chapman and Hall, London.
- Tompkin, R.B., L.N. Christiansen, A.B. Shaparis, and H. Bolin (1974). Effect of potassium sorbate on Salmonellae, Staphylococcus aureus, Clostridium perfringens and Clostridium botulinum in cooked uncured sausage. Appl. Microbiol. 27: 262.

Tompkin, R.B., L.N. Christiansen and A.B. Shaparis (1977).

Enhancing nitrite inhibition of Clostridium botulinum  
with isoascorbate in perishable canned cured meat. Appl.  
Env. Microbiol. 35: 59-61.

Towsend, C.T., L. Yee, and W.A. Mercer (1954). Inhibition of the  
growth of Clostridium botulinum by acidification. Food  
Res. 19: 536-542.

Troller, J.A. (1973). Effect of water activity and pH on  
Staphylococcal enterotoxin B production. Acta Aliment.  
2: 351.

Troller, J.A. and J.H.B. Christian (1978). "Water activity and  
food". Academic Press, London, New York.

Troller, J.A. (1980). Influence of water activity on microorganisms  
in foods. Food Technol. (may 1980): 76-80,82.

Vega de Pérez, M.E. (1982). Aspectos epidemiológicos del botulismo en Argentina, año 1978-1982. Boletín del Sector Vigilancia Epidemiológica e Inmunizaciones MSP y MA p 15-17.

Wagenaar, R.O. and Dack, G.M. (1955). Studies on canned cheese spread experimentally inoculated with spores of Clostridium botulinum. Food Research 20: 144-148.

Wentzel, L.M., M. Sterne and A. Polson (1950). High toxicity of pure type D toxin. Nature 166: 739-740.

Wodzinsky, R.J., and W.C. Frazier (1960). Moisture requirements of bacteria. Influence of temperature and pH on requeriments of Pseudomonas fluorescens. J. Bacteriol. 79: 572.

Wolf, A.V. (1966). "Aqueous solutions and Body Fluids". Harper (Hoeber), NY.